

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

PROGRAM: BIOLOGIE
OBOR: MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, GENETIKA A VIROLOGIE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



CHARAKTERIZACE PROTEINU HELD Z *BACILLUS SUBTILIS*

CHARACTERIZATION OF THE HELD PROTEIN FROM *BACILLUS SUBTILIS*

Bc. Petra Sudzinová

Diplomová práce
Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.5. 2013

Bc. Petra Sudzinová

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala všem, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Děkuji svému školiteli Mgr. Liborovi Krásnému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Děkuji také Mgr. Janě Korelusové za uvedení do experimentálního výzkumu, rady a spolupráci na projektu. Dále děkuji i všem ostatním kolegům z Laboratoře molekulární genetiky bakterií za vytvoření příjemného pracovního prostředí a všestrannou pomoc.

V neposlední řadě také děkuji své rodině za jejich podporu během celého studia.

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2010 – 2013 v rámci grantového projektu P372/11/0855 za podpory Grantové agentury České republiky.

Abstrakt

ÚVOD: Bakteriální RNA polymeráza (RNAP) je intenzivně studovaný enzym, který je klíčový pro genovou expresi. V Laboratoři molekulární genetiky bakterií byl objeven nový protein, HelD, interagující s RNAP z bakterie *Bacillus subtilis* – tedy potenciální transkripční faktor. HelD je protein o velikosti cca 90 kDa, který je příbuzný s proteiny helikázové rodiny UvrD/Rep, rozplétajících DNA ve směru 3'-5'. Role proteinu HelD v buňce nicméně ještě není známá a rovněž nebyla dosud studována případná role HelD v transkripci.

CÍLE: Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat protein HelD.

PŘÍSTUPY: Charakterizace HelD probíhala na třech úrovních: (i) bioinformatická analýza *in silico* byla použita k nalezení homologů proteinu HelD v jiných bakteriálních druzích; (ii) růstové testy *in vivo* byly použity pro nalezení fenotypu Δ HelD kmene v porovnání s divokým typem a (iii) biochemické experimenty *in vitro* byly použity k popsání efektu HelD na transkripci a k otestování, zda dokáže HelD vázat a rozplétat DNA.

VÝSLEDKY: Bioinformatická analýza *in silico* ukázala, že protein HelD se vyskytuje u kmene *Firmicutes* G+ bakterií důležitých pro průmysl i medicínu. Fenotypové růstové testy odkryly, že HelD je protein důležitý pro rychlou adaptaci buňky na změny v prostředí. Biochemické experimenty ukázaly, že HelD stimuluje transkripci, přestože nevykazuje helikázovou aktivitu.

Závěrem – tento projekt prokázal roli HelD v transkripci a rozšířil tak porozumění transkripčnímu aparátu.

klíčová slova: HelD, *Bacillus subtilis*, transkripce, RNA polymeráza, helikáza

Abstract

BACKGROUND: Bacterial RNA polymerase (RNAP) is an extensively studied enzyme required for gene expression. In our Laboratory we found a new protein named HelD. HelD copurifies with *B. subtilis* RNAP. HelD is a ~90 kDa protein from the UvrD/Rep helicase family, which contains protein with the 3'–5' DNA unwinding activity. The molecular role(s) HelD in cell are still unknown and its potential role in transcription has not been studied so far.

OBJECTIVE: The main aim of this Diploma project was to describe HelD.

APPROACHES: The characterization was carried out on three levels: (i) bioinformatics analysis *in silico* was used to identify HelD homologs in other bacteria; (ii) growth tests *in vivo* were used to determine the phenotype(s) of the HelD-null mutant strain compared to wt; and (iii) biochemical experiments *in vitro* were utilized to describe the effects of HelD on transcription, and to test whether HelD has DNA binding and DNA unwinding activities.

RESULTS: The *in silico* analysis revealed that HelD is present in *Firmicutes*, an industrially and medically important group of G+ bacteria. The phenotypic experiments showed that HelD is required for rapid adaptations to nutritional changes in the environment. The biochemical experiments showed that HelD stimulates transcription despite the fact that it does not have helicase activity.

In summary, this project has advanced on understanding of the transcription machinery in general and the HelD protein in particular.

keywords: HelD, *Bacillus subtilis*, transcription, RNA polymerase, helicase

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract	4
Obsah.....	5
Seznam zkratk	8
1 Úvod.....	11
2 Literární přehled	12
2.1 Bakteriální RNA polymeráza.....	12
2.1.1 Podjednotky RNAP.....	13
2.1.2 Srovnání RNAP u <i>E. coli</i> a <i>B. subtilis</i>	15
2.2 Transkripce	16
2.2.1 Promotor.....	16
2.2.2 Inicie	17
2.2.3 Elongace	19
2.2.4 Terminace.....	19
2.3 Proteiny z rodiny helikáz	19
2.3.1 Obecná charakteristika helikáz	20
2.3.2 Helikázové motivy	22
2.3.3 HelD (<i>yvgS</i>) z <i>B. subtilis</i>	25
2.3.4 RapA z <i>E. coli</i>	26
3 Cíle.....	28
4 Materiály a metody	29
4.1 Přístroje.....	29
4.2 Chemikálie, enzymy a další preparáty	31
4.3 Bakteriální kmeny	34
4.4 Vektory	35
4.5 Práce s mikroorganismy.....	37
4.5.1 Kultivace bakterií	37
4.5.2 Sporulace.....	38
4.5.3 Měření optické denzity (OD)	38
4.6 Práce s DNA	39
4.6.1 Izolace plazmidové DNA z <i>Escherichia coli</i> DH5α	39

4.6.2	Restrikční analýza	40
4.6.3	Elektroforetická analýza DNA	40
4.6.4	Izolace z gelu	41
4.6.5	Klonování DNA	43
4.6.5.1	Příprava DNA inzertů	43
4.6.5.2	Ligace	44
4.6.5.3	Transformace plazmidu do <i>Escherichia coli</i>	44
4.6.5.4	Sekvenační reakce	45
4.6.5.5	Tvorba glycerinové konzervy	46
4.7	Práce s proteiny	46
4.7.1	Exprese a izolace proteinu HelD s kinázovací doménou	46
4.7.2	Dialýza – pročištění proteinového izolátu	47
4.7.3	Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů v prostředí SDS	48
4.7.4	Nativní polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů	49
4.7.5	Značení proteinů Proteinkinázou A pomocí [γ – ^{32}P] – ATP	50
4.8	Helikázové experimenty – Gel Shift	51
4.8.1	Testování vazby DNA na HelD	51
4.8.1.1	Příprava radioaktivně značené DNA	51
4.8.1.2	Vazba DNA	52
4.8.2	Testování helikázové aktivity HelD	53
4.8.2.1	Příprava DNA substrátů	53
4.8.2.2	Helikázové experimenty	54
4.9	Transkripční experimenty	55
4.9.1	Určování aktivity jednotlivých proteinů na promotoru <i>Pveg</i>	56
5	Výsledky	59
5.1	Experimentální strategie	59
5.2	Bioinformatické charakteristiky <i>in silico</i>	60
5.2.1	Základní charakteristika	60
5.2.2	Homology HelD	61
5.3	Fenotypové srovnávací testy <i>in vivo</i>	64
5.4	Biochemické experimenty <i>in vitro</i>	73

5.4.1	Příprava modifikovaného proteinu HelD s kinázovací doménou	73
5.4.2	Může HelD vázat a rozplétat DNA?	76
5.4.2.1	Vazba DNA	76
5.4.2.2	Helikázové experimenty	77
5.4.3	Efekt HelD na transkripci <i>in vitro</i>	79
6	Diskuze	81
6.1	Hledání homologů HelD v jiných bakteriálních kmenech.....	81
6.2	Charakteristika HelD fenotypovými testy <i>in vivo</i>	81
6.3	Biochemické experimenty <i>in vitro</i>	82
6.4	Srovnání HelD a RapA	83
7	Závěr	84
8	Seznam použité literatury	85

Seznam zkratek

AK		aminokyselina
bp	base pair	pár bazí
<i>B. subtilis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
CTD	COOH-terminal domain	karboxy-koncová doména
DNA	deoxyribonucleid acid	kyselina deoxyribonukleová
dsDNA	double stranded DNA	dvojvláknová DNA
E	core enzyme RNAP	jádro RNAP
$E\sigma^{70}$	RNAP holoenzyme with σ^{70}	RNAP holoenzym s σ^{70}
<i>E. coli</i>		<i>Escherichia coli</i>
G-	gram negative bacteria	gramnegativní bakterie
G+	gram positive bacteria	grampozitivní bakterie
NK		nukleová kyselina
nt	nucleotide	nukleotid
NTD	NH ₂ -terminal domain	amino-koncová doména
NTP	nukleosid 5'-triphosphosphate	nukleosid 5'-trifosfát
OD	optical density	optická hustota
PKA	protein kinase A	protein kináza A
RNA	ribonucleid acid	kyselina ribonukleová
RNAP	DNA dependent RNA polymerase	RNA polymeráza závislá na DNA
RP _c	closed complex RNAP:promoter	uzavřený komplex RNAP a promotoru
RP _I	intermediate complex	přechodný komplex
RP _o	open complex	otevřený komplex
ssDNA	single stranded DNA	jednovláknová DNA
TNX	transkription	transkripce
TE	transcription elongation	elongace v transkripci
TEC	transcription elongation complex	elongační komplex u transkripce
TF	transcription factor	transkripční faktor

1 Úvod

Bakterie jsou dominantní forma života na zemi. Můžeme je najít v nejrůznějších přírodních podmínkách. Souvisí to s jejich schopností rychle reagovat na změny v prostředí a patřičně regulovat svou genovou expresi.

Základním krokem bakteriální genové exprese je transkripce a hlavním enzymem transkripce je bakteriální RNA polymeráza (RNAP). Funkce RNAP a transkripce může být regulována mnoha způsoby. Regulace může být zprostředkována malými molekulami, jako jsou iniciační nukleosidtrifosfáty a ppGpp, nebo bílkovinnými transkripčními faktory (TF).

Jedním z modelových organismů, který je zkoumán v naší laboratoři, je bakterie *Bacillus subtilis*. Je to půdní grampozitivní bakterie. V této bakterii je 4100 kódujících genů (Kunst et al., 1997), ze kterých u 1800 ještě není zcela známa zatím jejich funkce (Ogasawara, 2000). Jedním z těchto genů je i protein HelD, kódovaný genem *yvgS*, který byl objeven v naší laboratoři jako hlavní protein kopurifikující s RNAP.

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací proteinu HelD z *B. subtilis*. Charakterizace byla prováděna pomocí bioinformatiky *in silico*, kdy jsem srovnávala sekvence známých helikázy k nalezení homologních proteinů v jiných organismech, dále srovnávacími fenotypovými růstovými testy divokého kmene a kmene mutovaného v genu pro HelD a biochemickými experimenty *in vitro*, kdy jsem sledovala vazbu DNA na HelD a také schopnost HelD rozplétat DNA. Diplomová práce je rozdělena do dvou částí. V první se věnuji shrnutí poznatků o transkripčním aparátu bakteriální buňky a genové exprese. Druhá, experimentální, část popisuje provedené experimenty na modelovém organismu *B. subtilis*.

2 Literární přehled

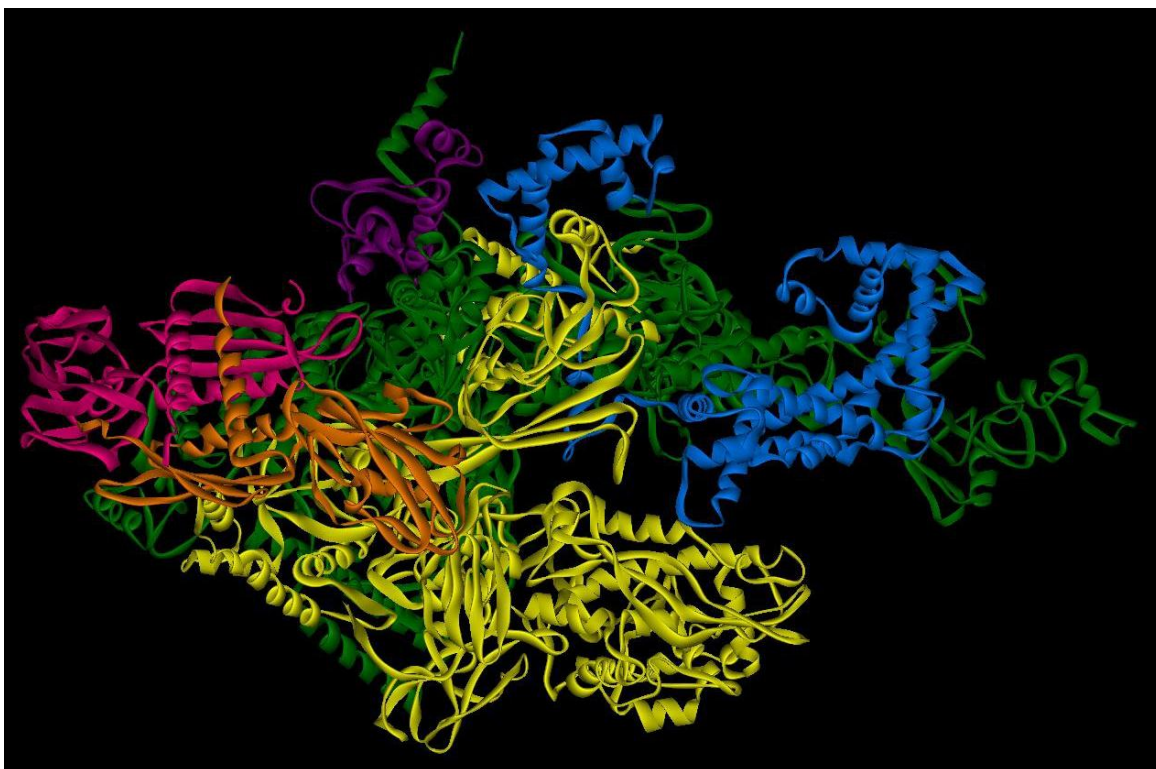
2.1 Bakteriální RNA polymeráza

Hlavním enzymem transkripce je RNA polymeráza. Bakterie ve svých buňkách obsahují pouze jednu formu tohoto enzymu – DNA dependentní RNA polymerázu. Katalytické jádro enzymu (E) s molekulovou hmotností přibližně 400 kDa se skládá z pěti podjednotek - dimeru podjednotek α (α_2), podjednotek β a β' , a podjednotky ω . Všechny tyto podjednotky jsou vysoce konzervované a jejich homology můžeme najít i u archeí a eukaryot.

Jádro RNAP není schopné samo o sobě rozeznat promotor a zahájit transkripci. K tomu je potřeba, aby se na E navázala další podjednotka, specifická pro bakteriální říši, podjednotka σ . Komplex jádra a podjednotky σ se nazývá RNAP holoenzym ($E\sigma$). Podjednotek (faktorů) σ je vícero druhů a každá rozeznává jinou skupinu promotorů s různou specifitou.

Skládání jádra probíhá samovolně, mechanismem *self-assembly*, kdy dimer podjednotek α vytváří lešení, na které se navazují katalytické podjednotky β a β' , které dodávají RNAP charakteristický tvar krabího klepeta. Podjednotka ω není pro bakteriální buňku esenciální a pomáhá β' při navazování na ostatní podjednotky (Haugen et al., 2008).

Mezi podjednotkami β a β' , rameny klepeta, se se nachází charakteristický kanál o šířce 27 Å (2,7 nm) což je přesně šířka dvouvláknového DNA templátu. Hluboko uvnitř tohoto kanálu se nachází aktivní místo, pro jehož správnou funkci jsou potřeba dva katalytické Mg^{2+} ionty. (Severinov, 2000)



Obrázek 1: Struktura RNAP u *Thermus thermophilus*.

Purpurovou a oranžovou barvou jsou znázorněny dvě podjednotky α , žlutě podjednotka β , zeleně β' , barvou modrou podjednotka σ a fialově podjednotka ω . (PDB ID: 1IW7)

2.1.1 Podjednotky RNAP

Detailní 3D struktura RNAP byla zatím zcela objasněna jen u *Thermus aquaticus* a *Thermus thermophilus* (Vassilyev et al., 2002); viz obrázek 1. U modelových organismů *Bacillus subtilis* (G+) a *Escherichia coli* (G-) jsou vytvořeny homologní modely struktury RNAP (MacDougall et al., 2005; Johnston et al., 2009). Následující charakteristika podjednotek bude ukázána na modelu *E. coli*.

Podjednotky α – jedna podjednotka je přibližně 330 AK dlouhá a má molekulovou hmotnost 36 kDa (Burgess, 1969). Skládá se ze dvou domén: větší N-koncové, která se podílí na dimerizaci a zodpovídá za vazbu na podjednotky β a β' , a menší C-koncové domény. Ta hraje důležitou roli při rozpoznávání promotoru a zvyšuje stabilitu vazby RNAP na promotor.

Podjednotka β – o délce 1342 AK a **podjednotka β'** – 1407 AK a molekulové hmotnosti kolem 150 kDa tvoří katalytické centrum enzymu. Jsou kódovány geny *rpoB* a *rpoC*. (Morse et al., 2002).

Podjednotka ω – je tvořena přibližně 90 AK a dosahuje hmotnosti 10 kDa, což z ní činí nejmenší podjednotku RNAP (Burgess et al., 1969). Je kódována genem *rpoZ*, který

se nachází ve stejném operonu jako gen *spoT*, který kóduje enzym ovlivňující koncentraci alarmonu (p)ppGpp v buňce. Tak by mohla podjednotka ω hrát roli ve stringentní odpovědi bakterií. (Vrentas et al., 2008)

Podjednotka σ – je nazývána také jako faktor σ . Je nepostradatelná pro iniciaci transkripce, zodpovídá totiž za navázání RNAP na promotorovou DNA. Pouze holoenzym $E\sigma$ je schopen rozpoznat promotor. Jádro RNAP je bez něj katalyticky aktivní, ale vazby neschopné. A ani samotný faktor σ není schopen účinně rozpoznat promotor, pravděpodobně díky nefunkční konformaci, která se změní až po vzniku holoenzymu (Severinov, 2000). Nicméně nové výzkumy dokazují, že se faktor σ sám o sobě omezeně a velmi slabě na promotor vázat může (Sevim et al., 2011; Yeh et al., 2011).

Podjednotky σ se dělí do dvou nepříbuzných rodin – σ^{70} a σ^{54} , pojmenovaných podle molekulových hmotností modelových faktorů σ (70 kDa a 54 kDa) (Gruber a Gross, 2003). Za transkripci základní sady genů u *E. coli* je zodpovědná podjednotka σ^{70} . *E. coli* dále obsahuje šest dalších podjednotek σ které jsou zodpovědné za změnu genové exprese například při odpovědi na nedostatek živin a stres v prostředí. Zvláštním případem je dvoupodjednotkový faktor u *B. subtilis*, složený z proteinů YvrI a YvrHa (MacLellan et al., 2009).

Faktor σ^{54} nemá žádnou sekvenční podobnost s σ^{70} , skládá se z jiných strukturních domén a není příbuzný ani ostatním faktorům σ . Tvoří promotorové komplexy za přítomnosti dalších bílkovinných aktivátorů, například protein Crl, který nese specifickou konzervovanou doménu, která řídí přeskupení komplexu RNAP:promotor, které je závislé na ATP, což vede k vytvoření otevřeného komplexu (*open complex*) (Browning a Busby, 2004). Holoenzym RNAP s σ^{54} rozpoznává promotorovou sekvenci blízko pozic -12 a -22 proti směru transkripce.

U grampozitivních bakterií je součástí RNAP ještě další **podjednotka, δ** , kódována genem *rpoE*. Je požadována pro specifitu jádra enzymu a váže se k jádru RNAP nezávisle na faktoru σ . (Lampe et al., 1988; Xue et al., 2010).

Další podjednotka, přítomná jen u G⁺ bakterií, je **podjednotka ω_1** , nově byl navržen název podjednotka ε . Je kódována je genem *yzkG*. Její přesná role v buňce není zatím objasněna.

2.1.2 Srovnání RNAP u *E. coli* a *B. subtilis*

Hlavní rozdíly mezi RNAP mezi *E. coli* a *B. subtilis* (Achberger a Whiteley, 1980; Artsimovitch et al., 2000):

- RNAP z *B. subtilis* je menší přibližně o 12%.
- RNAP z *B. subtilis* obsahuje 2 podjednotky navíc – δ a ϵ (ω_1).
- Jednotlivé podjednotky se u jednotlivých RNAP liší mírou homologie (například u podjednotek α je míra podobnosti 64%).
- RNAP z *B. subtilis* tvoří $E\sigma$ s základním faktorem σ^A o velikosti 43 kDa na rozdíl RNAP z *E. coli* ($E\sigma^{70}$).
- RNAP z *E. coli* tvoří většinou stabilní otevřené komplexy s promotorovou DNA při iniciaci transkripce, zatímco *B. subtilis* tvoří nestabilní otevřený komplex (Whipple a Sonenshein, 1992). Jak přesně vypadá otevřený komplex je podrobněji vysvětleno v kapitole 2.2.2.

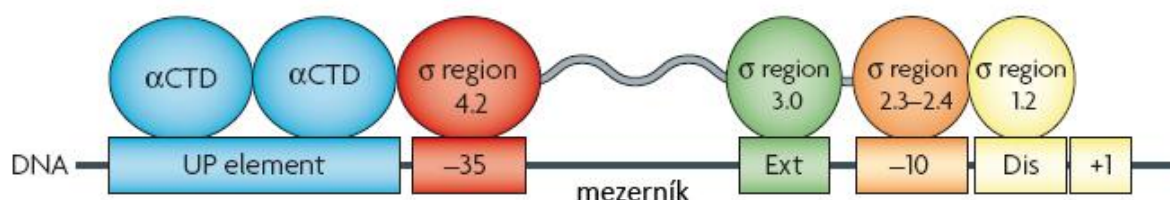
2.2 Transkripce

Transkripce je děj, kdy RNAP nasedne na specifické místo na dvouvláknové DNA, takzvaný promotor, rozplete jednotlivá vlákna DNA od sebe a vytvoří tak transkripční bublinu. Následně přepíše templátové vlákno DNA do RNA podle principu komplementarity. Transkripce zahrnuje tři procesy – iniciaci, elongaci a terminaci.

2.2.1 Promotor

Promotorová DNA umožňuje začátek transkripce genů. Promotory se nachází před příslušným genem proti směru transkripce (*upstream*, značí se záporným znaménkem) a spouští přepis genu z +1 místa. Sekvence po směru transkripce (*downstream*) se označuje znaménkem kladným. Nukleotid v pozici 0 neexistuje.

Promotor se dělí na několik základních částí (ve směru od +1 pozice proti směru transkripce) – oblast -10, rozšířenou oblast -10, oblast -35 a UP element. Schématické znázornění promotorové sekvence je vidět na obrázku 2. Pro rozeznání promotoru podjednotkou σ a pro následný start transkripce jsou nejdůležitější promotorové oblasti -35 a -10. UP element se naopak nemusí vyskytovat u všech promotorů.



Obrázek 2: Oblasti promotoru $E\sigma^{70}$ a podjednotky RNAP, které přispívají k jeho rozpoznání.

UP element interaguje s C-koncovými doménami α podjednotek RNAP (α CTD), oblast -35 s oblastí 4.2 podjednotky σ . Ext znamená rozšířenou -10 oblast interagující s oblastí 3 podjednotky σ , oblast -10 interaguje s oblastmi 2.3 a 2.4 podjednotky σ . Dis je diskriminátorový element vázající oblast 1.2 podjednotky σ . +1 označuje místo, odkud začíná transkripce. (Haugen et al., 2008)

Následný popis jednotlivých částí promotoru a jejich sekvencí je ilustrován na modelovém organismu *E. coli*.

UP element – AT bohatá oblast obvykle mezi -60 a -40. Nemusí se vyskytovat u všech promotorů, ale pokud je přítomen, zvyšuje aktivitu promotoru vazbou C-koncových domén α podjednotek RNAP. (Ross et al., 2001; Haugen et al., 2008). UP element se vyskytuje například u promotorů pro sedm hlavních ribozomálních

operonů. U *rrnB* P1 stimuluje aktivitu tohoto promotoru přibližně 30krát (Ross et al., 1993).

Oblast -35 – konsensus sekvence je určena hexamerem 5'-TTGACA-3'. Nachází se od -35 do -30 pozice proti směru transkripce. Je rozeznávaná doménou 4 (oblastí 4.2) podjednotky σ RNAP (Dehaseth et al., 1998).

Mezerník (spacer) – oblast oddělující oblasti -35 a -10, obvykle dlouhý 17 bp. Interaguje s N-koncovou doménou podjednotky β a tak se oblast, která svou vazbou ovlivňuje stabilitu komplexu RNAP:promotor nazývá β' zipper (Yuzenkova et al., 2011).

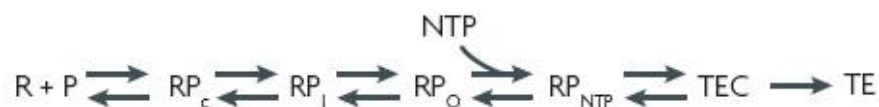
Rozšířená -10 oblast – 3 až 4 bp dlouhá oblast nacházející se před -10 oblastí. Interaguje s doménou 3 podjednotky σ . Je určena sekvencí 5'-TGX-3'. (Dehaseth et al., 1998)

Oblast -10 – nazývána také TATA box nebo Pribnowův box díky své konsensus sekvenci 5'-TATAAT-3', nacházející se od pozice -12 do -7 proti směru transkripce. Tato oblast interaguje s oblastmi 2.3 a 2.4 podjednotky σ (Haugen et al., 2008; Dehaseth et al., 1998).

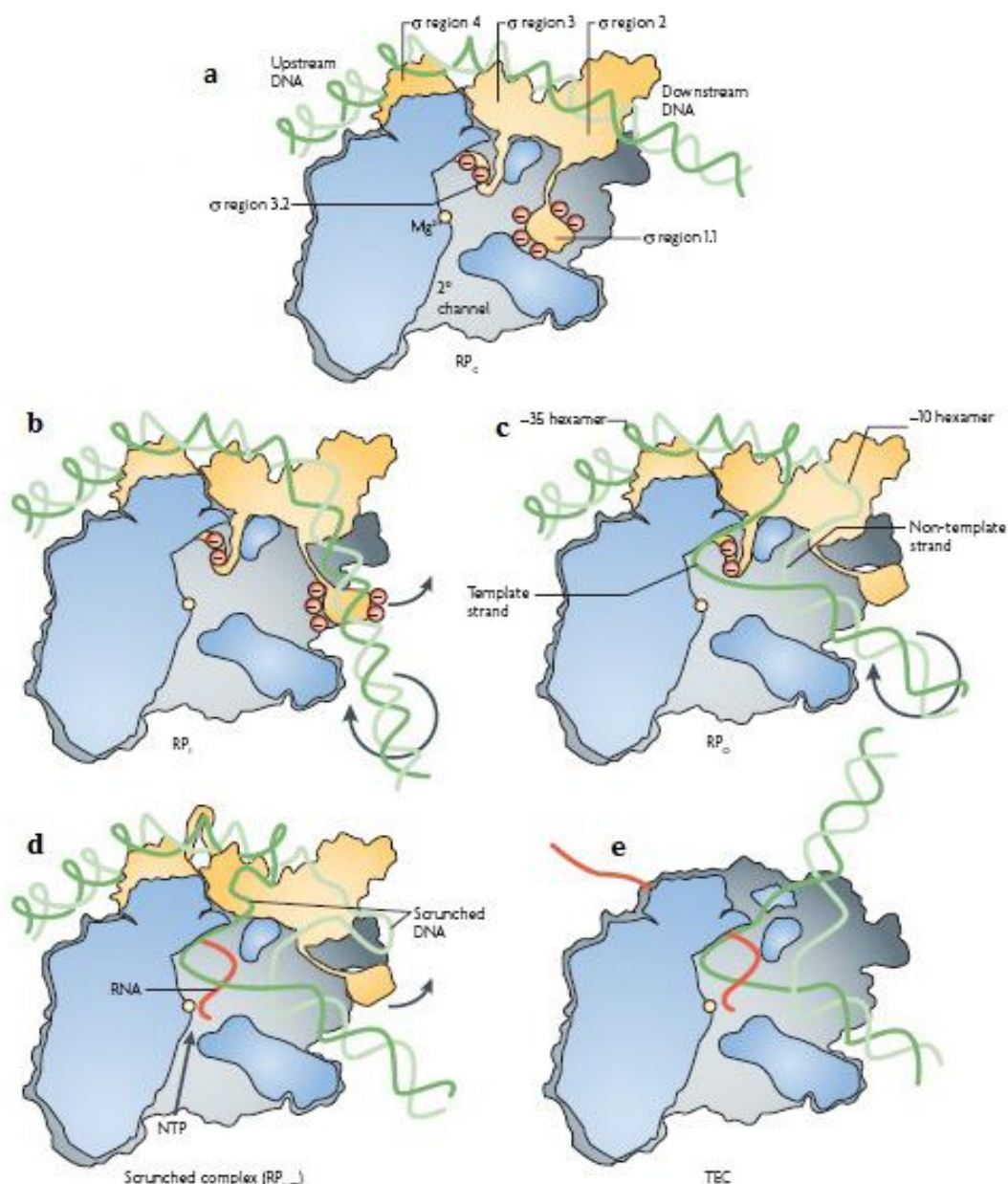
Oblast mezi -10 a +1 – má vliv na iniciaci transkripce, protože svým složením ovlivňuje stabilitu otevřeného komplexu RNAP:promotor. Pokud je tato oblast GC bohatá, je nazývána jako diskriminátor. Váže oblast 1.2 podjednotky σ . (Pemberton et al., 2000; Haugen et al., 2008)

2.2.2 Iniciace

První fáze transkripce se nazývá iniciace. RNAP při ní nasedá na specifickou sekvenci DNA, promotor. Vzniká tak takzvaný uzavřený komplex (RP_c), kdy jsou obě vlákna DNA stále ještě u sebe. Poté tento komplex přechází přes konformační mezistupeň s tvorbou intermediátů (RP_i), do komplexu otevřeného (RP_o), kdy už jsou vlákna DNA oddělena od sebe v transkripční bublině. V tomto stavu může být zahájena transkripce iniciačním nukleosidtrifosfátem (iNTP). Komplex dále přejde do stavu, kdy obsahuje DNA, RNAP a nově vznikající RNA a nazývá se raný elongační (TEC). (Chen et al., 2010) Průběh transkripce je znázorněn na následujícím schématu:



Podrobněji jsou všechny kroky znázorněny na obrázku 3.



Obrázek 3: Kroky iniciace transkripce

Tmavě zelenou barvou je znázorněno templátové vlákno DNA, světlezelenou nekódující vlákno, červeně nově vznikající transkript RNA. Mg²⁺ ionty v katalytickém místě jsou znázorněny žlutými kroužky, červené kroužky zastupují záporné náboje aminokyselinových zbytků oblastí 1.1 a 3.2 podjednotky σ.

a – představuje uzavřený komplex RP_c, kde je DNA stále ještě dvouvláknová.

b – V RP_i se oblast 1.1 podjednotky σ vysouvá směrem ven a DNA se po směru transkripce dostává do hlavního kanálu a jednotlivá vlákna se začínají od sebe rozplétat, vzniká transkripční bublina.

c – V RP_o jsou od sebe vlákna DNA plně oddělena a templátové vlákno se posouvá směrem k místu párování s prvním, iniciačním, nukleosidem.

d – Je zahájena syntéza RNA. DNA templátové vlákno je posouváno po směru transkripce, NTP k transkripci přicházejí sekundárním kanálem.

e – Podjednotka σ opouští jádro RNAP, zůstává elongační komplex (TEC) a syntéza RNA pokračuje. (Haugen et al., 2008)

podílejí na procesech replikace, rekombinace, opravy DNA, transkripce, translace a sestřihu RNA.

První helikáza byla popsána již v roce 1976 (Abdel-Monem a Hoffmann-Berling, 1976), první objevenou DNA helikázou byl Rep protein z *E. coli* v roce 1979 (Yarranton a Gefter, 1979) a od té doby bylo vyizolováno mnoho dalších helikáz z nejrůznějších organismů. Kupříkladu čtrnáct DNA helikáz z *E. coli*, šest z bakteriofágů a dvanáct z virů (Tuteja a Tuteja, 2004a).

První krystalizovaná DNA helikáza byla PcrA z termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus* (Velankar et al., 1999).

2.3.1 Obecná charakteristika helikáz

Helikázy lze charakterizovat podle jejich biochemických vlastností: podle schopnosti vázat NK, schopnosti vázat a hydrolyzovat NTP a schopnosti rozplétat dvě vlákna NK od sebe (za hydrolyzy NTP) ve směru 3'–5' nebo 5'–3'.

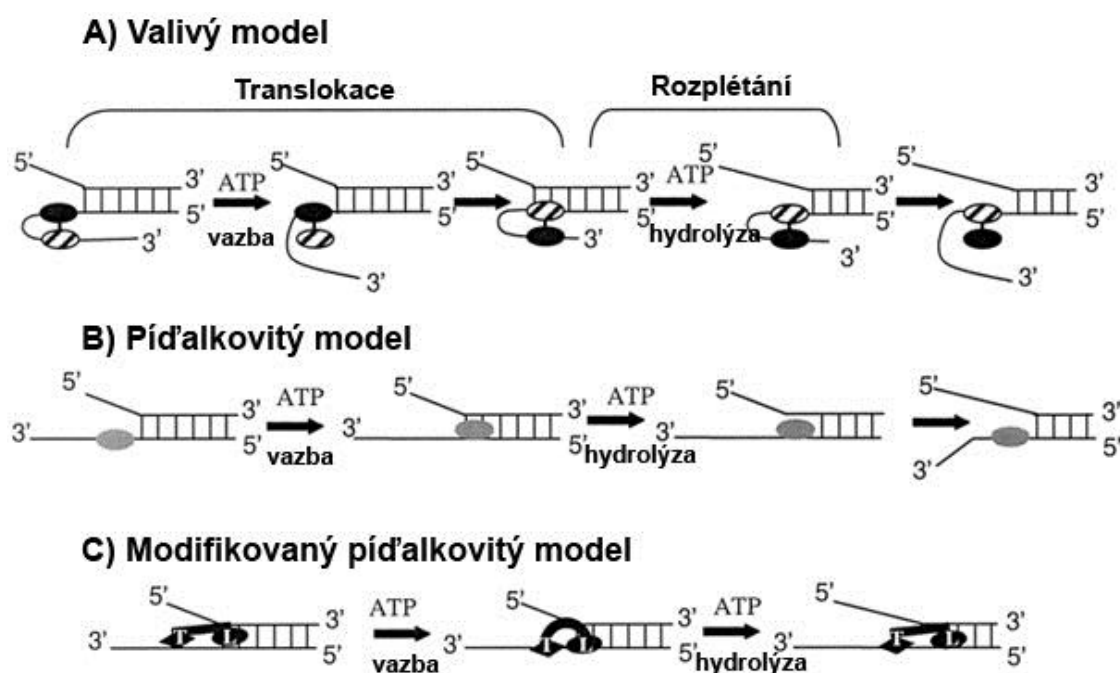
Dále můžeme helikázy charakterizovat jejich procesivitou, účinností, specifitou k různému druhu templátu.

Přestože helikázy katalyzují stejnou biochemickou reakci, způsob samotného rozplétání se může lišit, stejně jako forma, ve které jsou helikázy aktivní – monomerní, dimerní nebo hexamerní.

Bylo popsáno několik modelů, popisujících způsob, jakým helikázy katalyzují rozplétání dvou vláken NK od sebe, schéma aktivity je obrázku 5:

- **píďalkovitý** (*inchworm*) model, který byl navržen pro monomerní helikázy již v roce 1979 (Yarranton a Gefter, 1979). Po vyřešení krystalové struktury proteinu PcrA (Velankar et al., 1999) byl upřesněn pro translokaci PcrA podél jednovláknové DNA (*single stranded DNA*, ssDNA). V tomto modelu se helikáza naváže na ssDNA, poté se translokuje podél vlákna DNA do oblasti vidličky za navázání ATP. Hydrolyzou ATP se destabilizuje helix a uvolní se vlákno DNA.
- **valivý** (*rolling*) model, který byl navržen pro dimerní helikázy po vzoru helikázy Rep (Wong a Lohman, 1992). Obě podjednotky helikázy se navážou na jednovláknovou DNA, jedna podjednotka po navázání ATP opouští vazbu s DNA a váže se k duplexu v oblasti vidličky. Následuje destabilizace komplexu a uvolnění jednoho řetězce DNA, které doprovází hydrolyza ATP.

- model pro hexamerické helikázy rodiny F4. Podjednotky helikázy vytvářející prstencovou strukturu, skrz kterou prochází vlákno DNA a tak je zabráněno párování (Ahnert a Patel, 1997). Helikáza se pohybuje podél tohoto řetězce a tento s hydrolýzou NTP spřažený pohyb umožňuje helikáze rozvolnit párování v místě rozplétání (analogie klínu). Jiným vysvětlením je, že helikáza vytváří pnutí mezi řetězcí DNA a tím DNA rozvolňuje (torsní model).



Obrázek 5: Modely rozplétání.

Valivý model – podjednotky helikázy jsou odlišené šrafováním. Nejprve se obě podjednotky navážou na ssDNA, pak se jedna uvolní a naváže do oblasti vidličky. Rozvolní helix a následně se uvolní vlákno DNA za hydrolýzy ATP.

Píďalkovitý model – monomer se naváže na ssDNA, pohybuje se podél něj, dosáhne oblasti vidličky za navázání ATP. Rozvolnění helixu a uvolnění vlákna opět probíhá za hydrolýzy ATP.

Modifikovaný model píďalky – monomer helikázy obsahuje dvě DNA vazebná místa (T a L). Po navázání ATP změní enzym svou konformaci a tak se pohybuje podél DNA a rozplétá ji.

Upraveno podle (Tuteja a Tuteja, 2004b).

Rozdíl mezi modelem píďalky a valivým modelem je ten, že v případě modelu píďalky jsou nutná dvě vazebná místa na jednom monomeru helikázy – vazebné místo pro ssDNA a pro dsDNA. Pro valivý model jsou potřeba dvě podjednotky enzymu, které střídavě váží ssDNA a dsDNA. Podjednotky jsou obě totožné, jedná se tedy o homodimerní helikázy.

Byly však objeveny i homodimerní helikázy, za normálních podmínek rozplétající vlákna DNA od sebe podle valivého modelu, které tuto činnost mohou katalyzovat i v monomerním stavu (Mechanic et al., 1999). Byl tak popsán modifikovaný model píďalky, kdy jsou

přítomna vazebná místa pro DNA různé afinity. Vedoucí místo L (*leading*) má afinitu k duplexu DNA a také k ssDNA, zatímco druhé vazebné místo, vlečené T (*trailing*), má afinitu pouze k ssDNA.

Podrobným studiem funkčních modelů helikáz bylo zjištěno mnoho dalších zajímavých faktů, kupříkladu, že hexametrické DNA helikázy jsou schopné odstranit streptavidin z oligonukleotidů značených biotinem a tak naznačují roli helikáz v rezistenci vůči antimikrobiálním látkám (Morris a Raney, 1999). Helikázy mají během translokace velkou pohybovou energii, a tak jsou schopné odstranit jiné, blokující, proteiny z NK nebo rozplést oblasti stálých sekundárních struktur (Soultanas a Wigley, 2001). DNA helikáza z bakteriofágu T4 zas může rozplétat jak duplex DNA-DNA, tak i duplex DNA-PNA (PNA je zkratka užívaná pro *peptide nucleic acid*) a tento neobvyklý duplex má vyšší teplotu tání než dsDNA (Tackett et al., 2001).

2.3.2 Helikázové motivy

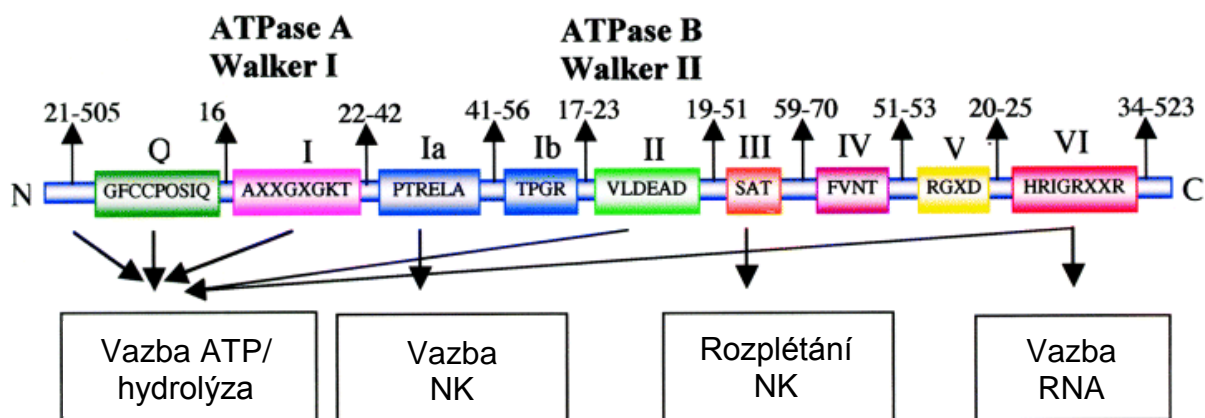
Srovnáním primárních struktur helikáz z mnoha organismů bylo nalezeno několik krátkých konzervovaných aminokyselinových motivů. Na základě těchto motivů byly helikázy rozčleněny do tří super-rodin (*superfamily*, SF) – SF1, SF2 a SF3. V rámci super-rodin se pak helikázy mohou podle podobností v některých motivech rozlišovat do pod-rodin, tříd nebo skupin.

Super-rodiny SF1 a SF2 jsou příbuzné rodiny zahrnující sedm konzervovaných motivů. Helikázové motivy byly popsány roku 1988 (Gorbalenya et al., 1988).

Rozdíl mezi rodinami je, že helikázy patřící do SF1, jako helikázy Rep, UvrD a PcrA, mají specifitu k jednovláknové DNA, zatímco helikázy z rodiny SF2, jako RecG a PriA, se specificky vážou na DNA dvouvláknovou. Rodina SF3 je mnohem menší, zahrnuje převážně helikázy virové a proteiny do ní spadající mají pouze tři konzervované motivy. Byla vyčleněna i rodina F4, malá a příbuzně velmi vzdálená skupina, obsahující helikázy bakterií a bakteriofágů. (Hall a Matson, 1999)

Hlavní helikázové motivy se označují: Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V a VI. Jejich uspořádání je zobrazeno na obrázku 6. Každá helikáza má obvykle více těchto motivů, podrobněji je níže popsáno šest z nich.

Helikázové motivy jsou obvykle odděleny úseky, které mají nízkou sekvenční konzervovanost, ale zachována mezi různými organismy je jejich délka. Má se za to, že právě tyto spojovací úseky jsou charakteristické pro jednotlivé specifické vlastnosti různých proteinů. Konzervované úseky jsou většinou zodpovědné za funkce pro helikázy charakteristické a esenciální, jako je vazba ATP, jeho hydrolyza nebo rozplétání vláken nukleových kyselin od sebe.



Obrázek 6: Schéma helikázových motivů DEAD box helikáz.

Helikázové motivy jsou seřazeny podle své pozice, od N-koncové domény proteinu po C-koncovou doménu. U každého motivu je napsána jeho konsenzus aminokyselinová sekvence. Popisky nad motivy určují jméno každého motibu, čísla mezi motivy jsou počty aminokyselinových zbytků, které se mezi motivy nachází. Ve spodní řadě se nachází definované funkce některých motivů. Upraveno podle (Tuteja a Tuteja, 2004b)

Motiv Q (Gly-Phe-X-X-Pro-Ile-Gln)

Tento motiv byl charakterizován jako poslední z helikázových motivů. Byl objeven jako unikátní sekvence před motivem I v případě RNA helikáz spadajících do tzv. DEAD box rodiny. Tento motiv se skládá z devíti aminokyselin, které obsahují charakteristický glutamin (Q), jež dal celému motivu název. Nachází se 15 – 22 AK před motivem I. U kvasinkového faktoru IeF-4A se motiv Q pravděpodobně podílí na vazbě a hydrolyze ATP. (Tanner et al., 2003)

Motiv I (Ala/Gly-X-X-Gly-X-Glu-Lys-Thr)

Motiv I byl původně popsán jako Walker motiv A u ATPáz. Pro RNA helikázy (SF1) je charakteristická sekvence AXXGXGKT, zatímco pro ATPázy, GTPázy a některé DNA helikázy (SF2) je to sekvence GXXXXXGKT. V těchto sekvencích může být za X dosazena jakákoli aminokyselina. Lysin (K) z tohoto motivu váže β a γ fosfáty ATP. Mutací této aminokyseliny na nenabitou je tato vazba znemožněna (Pause a Sonenberg, 1992). Spojení

hydrolyzy s rozplétáním NK naznačuje i to, že pokud je helikáza defektní v ATPázové aktivitě, duplex NK nerozplétá (Hall a Matson, 1999).

Motiv Ia (Pro-Thr-Arg-Glu-Leu-Ala)

Studie struktury tohoto motivu naznačují, že hraje důležitou roli ve vázání jednovláknových NK (Caruthers a McKay, 2002).

Motiv II (Val-Leu-Asp-Glu-Ala-Asp)

Tento motiv bývá nazýván také jako Walker motiv B u ATPáz. Proteiny obsahující tento motiv jsou nazývány DEAD box proteiny, podle charakteristické konsensus sekvence motivu. Modelovým proteinem DEAD box rodiny je eukaryotní iniciační faktor eIF-4A. Aminokyseliny DE z této sekvence jsou vysoce konzervované a objevují se v mnoha proteinech, které se účastní procesů replikace DNA a RNA. Kyselina asparagová (D) interaguje s Mg^{2+} , potřebným k navázání ATP. Tento motiv je pravděpodobně zodpovědný za spojení ATPázové a helikázové aktivity (Pause a Sonenberg, 1992). Jak je objevováno množství nových helikáz, objevují se i variace na tento motiv a tak vznikly podkupiny DEAH, DEXH a DEAH*.

Motiv III (Ser-Ala-Thr)

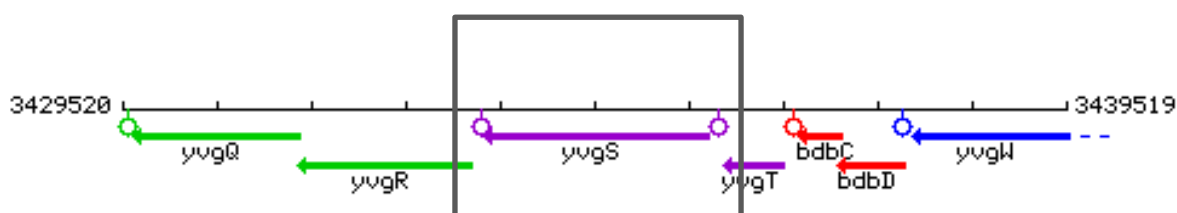
Motiv III je jedním z odlišujících znaků mezi super-rodinami SF1 a SF2. U rodiny SF2 hraje důležitou roli v rozplétání NK. Je možné, že motiv III v SF2 spojuje ATPázovou aktivitu s rozplétáním. Mutace v jeho sekvenci SAT na AAA v proteinu eIF-4A totiž vede ke ztrátě RNA helikázové aktivity, zatímco schopnost vázat a hydrolyzovat ATP i vázat RNA u eIF-4A zůstává (Pause a Sonenberg, 1992).

Motiv VI (Tyr-Ile-His-Arg-Ile-Gly-Arg)

Motiv VI zprostředkovává konformační změny spojené s navázáním nukleotidu, například ATP (Dillingham et al., 2001). Je to díky jeho malé vzdálenosti od místa vazby NTP a také DNA. Helikáze je tak umožněn pohyb podél NK.

2.3.3 HelD (*yvgS*) z *B. subtilis*

Protein HelD (kódován genem *yvgS* nebo také *helD*) je pravděpodobně helikáza a byl identifikována jako vazebný partner RNAP z *B. subtilis*. (Delumeau et al., 2011). Skládá se ze 774 AK a má velikost přibližně 90 kDa. Pozice na chromozomu *B. subtilis* je znázorněna na obrázku 7. Na základě své sekvence bylo předpovězeno, že je HelD DNA helikáza, rozplétající DNA ve směru 3'–5', spadající do rodiny UvrD/Rep. Do UvrD rodiny patří helikázy zodpovědné za opravu DNA a rekombinaci. Podle bioinformatických studií bylo předpovězeno, že se HelD skládá ze tří domén, viz obrázek 8.



Obrázek 7: Pozice *yvgS* na genomu *B. subtilis*.

Směry šipek určují směr přepisu jednotlivých genů, zelenou barvou jsou znázorněny geny zapojené do metabolismu, fialovou (jako v případě *yvgS*) ty, které jsou podobné neznámým proteinům, červeně gene zapojené do informačních dějů v buňce a modře ty, které jsou součástí buněčných procesů. Kolečkem je znázorněn terminátor. Zdroj: <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>.

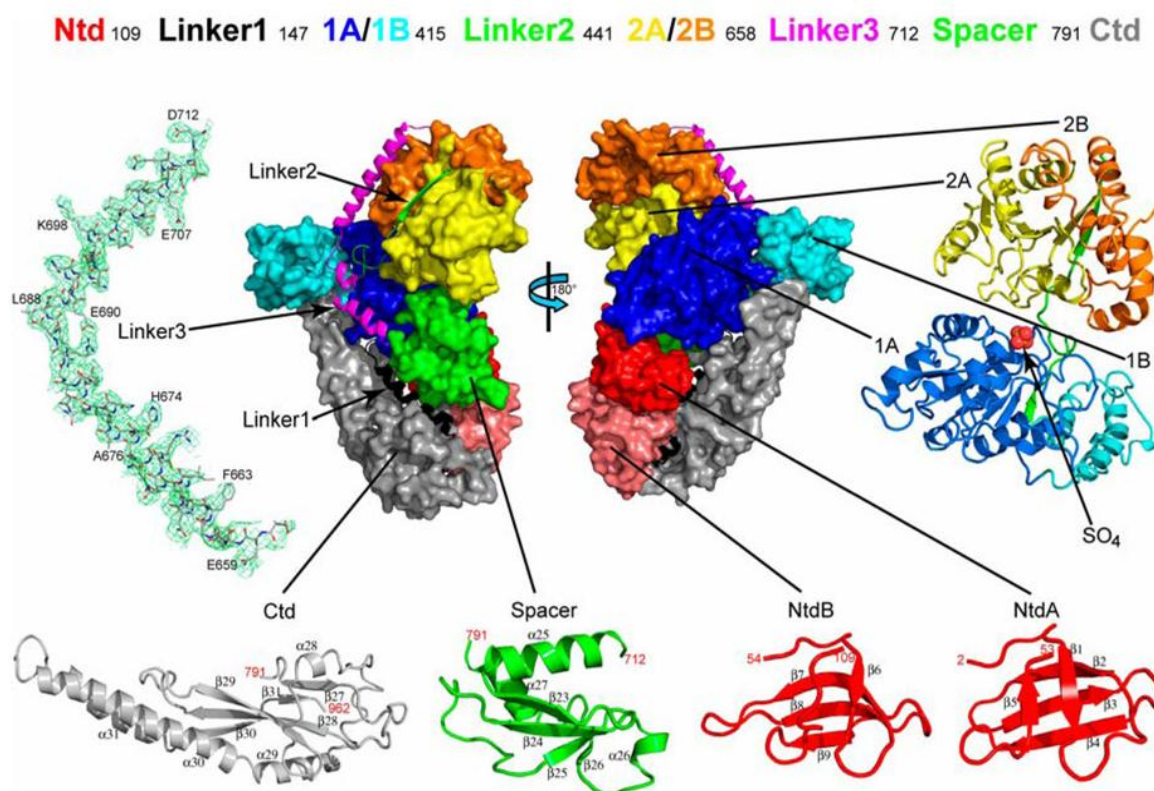


Obrázek 8: Pravděpodobná struktura domény HelD.

Žlutou barvou je znázorněna N-koncová doména, podobná doméně UvrD2, s pravděpodobným místem pro vazbu DNA, červeně středová doména s ATP vazebnou oblastí, zeleně C-koncová doména, konzervovaná v rámci širší bakteriální říše. Koval, T. (ústní sdělení)

HelD je exprimován ve vysokých hodnotách během exponenciální fáze růstu bakteriální buňky a jeho exprese je ještě navýšena při přechodu do fáze stacionární (Nicolas et al., 2012), viz obrázek 9.

HelD má pravděpodobně efekt na opravu DNA a homologní rekombinaci, kmen Δ HelD vykazuje zvýšenou citlivost k látkám poškozujícím DNA, například k UV záření (Carrasco et al., 2001). Nicméně přesná funkce tohoto proteinu v buňce není ještě známa.



Obrázek 10: Struktura RapA z *E. coli*.

Vrchní část znázorňuje pořadí domén RapA s počty AK zbytků mezi jednotlivými doménami. V prostřední části je model RapA ze dvou pohledů, lišícími se od sebe rotací o 180° podél vertikální osy. Okolo centrálního modelu jsou znázorněny sbalené jednotlivé domény, se zachovanou barevností. Komplex domén 1A, 1B, 2A a 2B vytváří jádro enzymu s ATPázovou aktivitou. N-koncová doména (Ntd) se skládá ze dvou poddomén, které se skládají totožně. (Shaw et al., 2008)

Jak už z pojmenování RapA vyplývá, váže se tento protein jednak na RNAP, ale váže se i na RNAP ve formě holoenzymu, konkrétněji na povrch podjednotek α a β' . Na jádro RNAP se váže s vyšší afinitou a tak se předpokládá jistá kompetice o vazebné místo s faktorem σ (Sukhodolets a Jin, 1998; Sukhodolets a Jin, 2000). RapA vykazuje stejně jako proteiny z rodiny SWI/SNF ATPázovou aktivitu, která je stimulována vazbou na RNAP (Sukhodolets a Jin, 2000). RapA napomáhá transkripci, stimuluje recyklaci RNAP molekul tak, že pozmění konformaci posttranskripčního komplexu a tím uvolní RNAP, která je tak k dispozici pro další transkripci. Recyklace RNAP závisí na ATPázové aktivitě RapA. RapA napomáhá transkripci za vysoké koncentrace solí, kdy je DNA pevně sbalena v nadšroubovicové formě a bez RapA by transkripce vůbec neprobíhala (Sukhodolets et al., 2001). Za nízké koncentrace NaCl nebyl tento efekt pozorován.

3 Cíle

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat nově objeveného interakčního partnera RNAP, protein HelD z *B. subtilis*.

Tato charakterizace byla prováděna pomocí bioinformatických srovnávání *in silico*, pomocí fenotypových testů *in vivo*, a také pomocí biochemických experimentů *in vitro*.

Bioinformatická charakteristika *in silico*:

- **Hledat homolog proteinu HelD i v jiných organismech.**

Fenotypové testy *in vivo*:

- **Porovnat růstové křivky divokého kmene *B. subtilis* a kmene s deletovaným proteinem HelD v různých podmínkách.**

Biochemické experimenty *in vitro*:

- **Připravit modifikovaný protein HelD s kinázovací doménou k ověření a vizualizaci vazby HelD na RNAP.**
- **Otestovat schopnost HelD vázat a rozplétat DNA.**
- **Otestovat vliv HelD na transkripci *in vitro*.**

4 Materiály a metody

4.1 Přístroje

Centrifugy

- **Beckman** Coulter Avanti J-26XPI (USA) – vakuová chlazená centrifuga s možností výměny rotorů
 - rotor JA (určený pro 8 kyvet o objemu 50 ml s maximálním odstředivým zrychlením až 75 600g)
- **Beckman** Model J2-21M (USA) – vakuová chlazená centrifuga s možností výměny rotorů
 - rotor JA 20 (určený pro 8 kyvet o objemu 50 ml s maximálním odstředivým zrychlením až 48 400g)
- **Heraeus** Cryofuge 8000 (Německo) – chlazená centrifuga s výkyvnými rotory (objem až 6 l) a s maximálním zrychlením 8 000g
- **Heraeus** Christ Biofuge A (Německo) – nechlazená mikrocentrifuga centrifuga pro 24 mikrozkušavek o objemu 1,5 ml, maximální odstředivé zrychlení je 13 000g
- **Universal** 16 R, Hettich (Německo) – chlazená mikrocentrifuga určená pro 24 mikrozkušavek s maximálním odstředivým zrychlením 20 000g.
- **Roth** microcentrifuge (Taiwan) – stolní centrifuga na mikrozkušavky určená pro krátké stáčení vzorků
- **Gilson** Capsulefuge PMC-880 (Francie) – stolní centrifuga na 8 mikrozkušavek určená pro krátké stáčení vzorků

Elektroforézy

- **OWL** (Anglie) – pro horizontální agarózovou elektroforézu, na velikosti gelů 7 x 8 cm a 11,5 x 13 cm
- **Thermo scientific OWL** P10DS – vertikální elektroforéza, velikost gelu 16 x 16 cm
- **Agarózová elektroforéza** (ČR) – velikost gelu: 6,5 x 7,5 cm
- **Mini-Protean II** – Bio-Rad (USA) – vertikální elektroforéza proteinů, velikost gelu 9,5 x 7,5 cm

- **XCell SureLock™ Mini-Cell** (USA) – vertikální elektroforéza proteinů, užívaná pro předpřipravené gely na SDS-PAGE a nativní elektroforézu, velikost gelu 8,5 x 9 cm
- **Elektroforetické zdroje Bio-Rad** (USA) – model 500/200 a PAC 3000

Inkubátory a třepačky

- **Thermo 120** (ČR) – termoblok s možným nastavením teploty (max. 120 °C)
- **Biological** Termostat BT120 (ČR) – inkubace Petriho misek
- **Biosan** Multi-Shaker PSU 20 (ČR) – stolní třepačka vhodná pro inkubaci kultur v tekutých médiích
- **Stuart-block** heater SBH130D (Anglie) – termoblok s možným nastavením teploty
- **Biosan MR-1** mini-rocker (ČR) – třepačka s kývavým pohybem užívaná pro promývání gelů
- **Gilson-vortex** GVLab (Německo) – stolní vortex

PCR cyclery (USA)

- **PTC 100** MJ Research (cyclery s jedním termoblokem pro jeden typ mikrozku mávek)
- **PTC 200** MJ Research (cyclery s dvěma termobloky)

Další přístroje

- **Analytické váhy** Kern ABJ a Kern EG (Německo)
- **Geigerův-Müllerův počítač** – mini monitor Series 900 (Anglie)
- **pH metr** – pH 510 Oakton Instruments (USA)
- **Phosphoimager** – Bio-Rad Molecular Imager FX (USA) a kazeta s expoziční fólií BAS-MS2040 Fuji (Japonsko)
- **Sonikační zařízení** – Hielschner UP200S (Německo)
- **Spektrofotometr** – Shimadzu UV-1601
- **Spektrofotometr na mikrotitrační destičky** sunrise Absorbance Reader - TECAN (Švýcarsko)
- **Sušička gelů** Biomedra D 62 – Schoeller (Německo)

- **Transiluminátor** UVT-20M Herolab (Německo)
- **Vakuová pumpa** KNFLAB Laboport (Německo/USA)

4.2 Chemikálie, enzymy a další preparáty

[α – ^{32}P] – UTP (M.G.P., ČR)

[γ – ^{32}P] – ATP (M.G.P., ČR)

β -merkaptoethanol (Serva, Německo)

Aminokyseliny (AppliChem, Německo)

Agar pro pevné půdy (Lachema, ČR)

Agaróza pro molekulární biologii (Lachema, ČR)

Aqua pro injectione biotika (Biotika, SR)

Akrylamid (Serva, Německo)

Amoniumpersulfát (Serva, Německo)

Ampicilin (Biotika, SR)

BSA (Sigma, USA)

Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, Německo)

dNTP - ATP, CTP, GTP, UTP (Roche, USA)

EDTA (Chelaton III, Lachema, ČR)

Ethidium bromid (Sigma, USA)

Ethanol 96% (PENTA, ČR)

Erythromycin (Biotika, SR)

Expand High Fidelity PCR System - Taq a Tgo polymerázy (Roche, Německo)

Glycerol (Sigma, USA)

Glykogen (Sigma, USA)

Chloramfenikol (Sigma, USA)

Imidazol (Sigma, USA)

Izopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) (Sigma, USA)

N, N, N', N' - tetramethylethyldiamine (TEMED) (LKB, Švédsko)

N, N' - methylenbisacrylamid (Serva, Německo)

MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (Roth, Německo)

Persíran amonný (Serva, Německo)

Protein kináza A (Promega, USA)

Restrikční endonukleázy –, *EcoR* I, *Bam*HI, *Hind* III, *Xho*I (TaKaRa, Japonsko)

SDS (Serva, Německo)

T4 DNA ligáza (TaKaRa, Japonsko)

Tris-HCl (Serva, Německo)

složení kultivačních médií:

LB (Luria – Bertoni) médium (na 1 litr)

trypton	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O	doplnit do 1 litru

MOPS médium (100 ml)

0,05 M	MOPS pH 7.0	10 ml
0,01 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 ml
0,01 M	KH ₂ PO ₄	0,2 ml
0,002 M	MgCl ₂	0,1 ml
0,002 M	CaCl ₂	0,2 ml
0,005 M	MnCl ₂	0,005 ml
0,40%	25% zdroj uhlíku	1,6 ml
0,000005 M	FeCl ₃	0,01 ml
50 ug/ml	AK	5 ml
	ddH ₂ O	doplnit do 100 ml

CH (casein-hydrolyzate) médium (1 litr)

100 mM	CaCl ₂	1 ml
1 M	MgSO ₄	0,4 ml
50 mM	MnSO ₄	2,0 ml
1%	tryptofan	5 ml
	roztok G	doplnit do 1 litru

roztok G (na 2,35 litru)

Casein hydrolyzate broth	25,0 g
L-glutamát sodný	9,2 g
L-alanin	3,125 g

L-asparagin	3,48 g
KH ₂ PO ₄	3,40 g
NH ₄ Cl	1,34 g
Na ₂ SO ₄	0,27 g
NH ₄ NO ₃	0,24 g
FeCl ₃ *6H ₂ O	2,45 mg

rozpustit v 1 litru, upravit pH pomocí 2 M NaOH na 7,0 a doplnit na 2,35 litru

SM (Sterlini – Mandelstam) médium (100ml) podle (Sterlini a Mandelstam, 1969)

sporulační soli	90 ml
5% L-glutamát sodný	4,0 ml
0,1M CaCl ₂	1,0 ml
1M MgSO ₄	4,0 ml

sporulační soli (1000 ml)

dH ₂ O	989 ml
roztok A	1 ml
roztok B	10 ml

roztok A (na 100 ml)

FeCl ₃ *6H ₂ O	0,089 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,830 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	1,979 g

roztok B (na 1000 ml)

NH ₄ Cl	53,5 g
Na ₂ SO ₄	10,6 g
KH ₂ PO ₄	6,8 g
NH ₄ NO ₃	9,7 g

rozpustit v 800 ml vody, přidat 2 M NaOH na pH 7,0, doplnit na objem 1 litr

4.3 Bakteriální kmeny

Tabulka 1: Seznam bakteriálních kmenů:

Bakteriální kmen	Genotyp	Původ
<i>B. subtilis</i>		
MH5636 (LK809)	<i>rpoC</i> -His10	(Qi a Hulett, 1998)
MGNA-A456	<i>helD</i> ::MLS	National BioResource Project (NIG, Japan)
LK637	MH5636 <i>rpoC</i> -His10; <i>rpoE</i> ::kan	(Rabatinova et al., 2013)
LK782	MH5636 <i>rpoC</i> -His10, <i>helD</i> ::MLS	(Korelusová et al., rukopis v přípravě)
LK1032	MH5636 <i>rpoC</i> -His10; <i>rpoE</i> ::kan; <i>helD</i> ::MLS	(Korelusová et al., rukopis v přípravě)
BasySBio (LK917)	168trp+	(Nicolas et al., 2012)
LK974	BasySBio <i>helD</i> ::MLS	
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F– <i>ompT hsdS(rB– mB–) gal dcm λ</i> (DE3)	
DH5α	<i>supE44; ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15); hsdR17; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; rel-A1</i>	Invitrogen
LK800	DH5α plazmid pET151/D-TOPO® <i>helD</i> ::MLS	(Korelusová et al., rukopis v přípravě)
LK918	BL21(DE3) <i>HelD</i> -PKA	tato práce
LK919	BL21(DE3) <i>HelD</i> -PKA 2	tato práce

Kmen LK782 s delecí v genu pro *HelD* byl připraven v naší laboratoři transformací kmene MH5636 (s β' podjednotkou RNAP značenou deseti histidiny) pomocí chromozomální DNA z kmene MGNA-A456. Kmen MGNA-A456 byl naší laboratoři laskavě propůjčen z Japonska, z National BioResource Project.

Kompetentní buňky *E. coli* (DH5α používané pro klonování a BL21(DE3) používané pro nadprodukcí proteinů) byly připraveny v naší laboratoři podle obvyklých postupů (Hanahan, 1983).

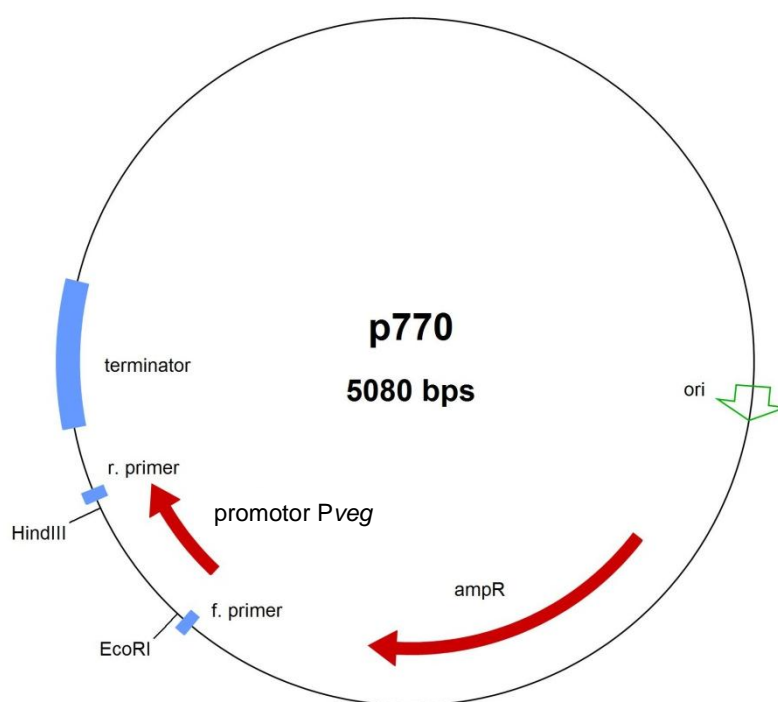
4.4 Vektory

Plazmid p770

Původní plazmid byl získán od autorů práce (Ross et al., 1990) a byl do něj vnesen promotor *Pveg* (-38/-1/+1G) (Krasny a Gourse, 2004).

Plazmidová DNA tohoto vektoru pak byla použita jako templátová DNA při PCR s radioaktivními primery v experimentu, kdy byla testována vazba *HelD* na DNA.

Tento plazmid obsahuje stabilní promotor *Pveg*, na kterém byly prováděny transkripční experimenty *in vitro*. Promotor *Pveg* vytváří stabilní otevřené komplexy s RNAP a je stabilně přepisován v průběhu bakteriálního růstu, je to tedy silný konstitutivní promotor (Krasny et al., 2008). Dále plazmid obsahuje na proteinu Rho nezávislý transkripční terminátor, β -laktamázový gen, jako selekční marker, který poskytuje rezistenci vůči ampicilinu, a promotor pro RNA 1, který je součástí počátku replikace (RNA1 slouží pro regulaci počtu kopií plazmidu v buňce). Schéma plazmidu je znázorněno na obrázku 11.



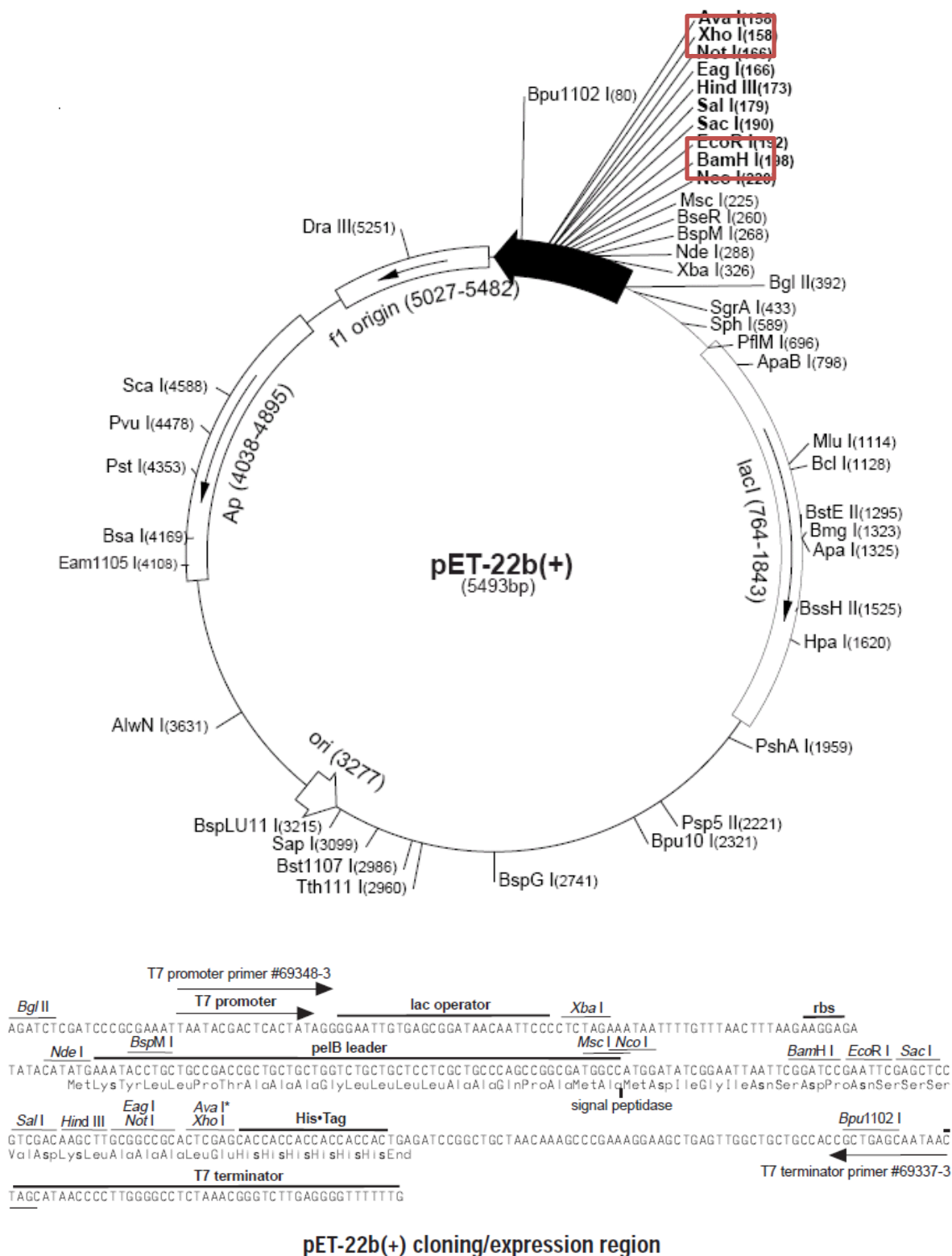
Obrázek 11: Schéma plazmidu p770.

Schéma plazmidu použitého pro transkripční experimenty *in vitro*. Promotor *Pveg* byl zaklonován pomocí restrikčních enzymů *HindIII* a *EcoRI*.

Plazmid pET-22b

Vektor slouží ke klonování genů a následné nadprodukci proteinů. Obsahuje inducibilní promotor T7, restriční místa *XhoI* a *BamHI*, mezi které jsou vkládány požadované geny

a histidinovou kotvu, která je pak připojena na C-konec proteinu. Byl zakoupen od firmy Novagen, jeho schéma je znázorněno na obrázku 12.



Obrázek 12: Plazmid pET22b(+)

Schéma plazmidu použitého pro klonování a nadprodukci proteinů. Zvýrazněna jsou restriční místa *Xho*I a *Bam*HI. Zdroj: <http://www.addgene.org/12651/>.

Plazmid pET22b-PKA (LK403)

Doména PKA, která se následně připojuje k proteinům a slouží k interakčním experimentům, byla zaklonována do plazmidu pET22b již dříve v naší laboratoři pomocí restrikčních míst *NdeI* a *BamHI*. Takto modifikovaný plazmid byl označen jako pET22b-PKA (LK403).

Plazmid pET151/D-TOPO®

Vektor obsahuje inducibilní promotor T7, epitop V5 pro imunodetekce a histidinovou kotvu, která se připojí na C-konec proteinu a slouží k izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie. Plazmid byl dodán komerční firmou Invitrogen.

4.5 Práce s mikroorganismy

Kultivace byla prováděna v Erlenmeyerových baňkách o vhodném objemu se zátkou z buničité vaty a gázy. Objem baňky byl zvolen tak, aby objem kultury představoval maximálně 1/3 objemu baňky.

Všechna média byla připravována sterilně a přefiltrována.

4.5.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakterií v tekutém médiu probíhala aerobně, za třepání v 37 °C v termostatu. Kultivace na pevných agarových půdách probíhala také v termostatu při 37 °C.

Provedení:

- Z glycerinové konzervy bylo zaočkováno 10 ml LB média nebo MOPS média s příslušným antibiotikem a kultura byla nechána růst 12-16 hodin ve 37 °C za stálého třepání.
- Narostlou kulturou bylo zaočkováno 50 ml čerstvého předehřátého média bez antibiotika na OD₆₀₀ 0,03. Následná inkubace probíhala za stálého třepání v 37 °C a v časových intervalech byla měřena OD₆₀₀ a vynášena do grafu znázorňujícího růstovou křivku kultury.
- V případě potřeby je narostlá kultura rozetřena na agarové misky z modifikovaného média a nechána opět kultivovat v 37 °C po dobu 12 hodin.

4.5.2 Sporulace

Bakteriální kultura byla nechána rozrůst v definovaném CH médiu a pak se přesadila do média indukujícího sporulaci (SM). První spory vznikaly po 6 hodinách. V časových intervalech se z kultury odebíraly vzorky, část byla natřena na misky – ke zjištění množství živých buněk, a druhá část je povařena, aby se zabily veškeré živé buňky a po natření na miskách vytvořily kolonie pouze spory. Do grafu byl poté vynesena poměr spor ku živým buňkám v daném čase.

Provedení:

- Z glycerinové konzervy bylo zaočkováno 10 ml CH média s příslušným antibiotikem a kultura byla nechána růst 12-16 hodin ve 37 °C za stálého třepání.
- Narostlou kulturou bylo zaočkováno 50 ml čerstvého předeštěného CH média bez antibiotika na OD₆₀₀ 0,03. Následná inkubace probíhala za stálého třepání v 37 °C, dokud nebylo z růstové křivky patrné, že se kultura začíná přecházet do stacionární fáze (OD 0,6 -0,8).
- Z kultury bylo odebráno 40 ml a vzorek byl centrifugován po dobu 10 minut 40 000g při pokojové teplotě.
- Supernatant byl slit a pelet resuspendován v předeštěném SM médiu stejného objemu (40 ml).
- Byl odebrán první vzorek (t_0) – 1 ml, který je rozdělen na dvě části. 500 µl bylo zahřáto na 80 °C po dobu 15 minut. Další 500 µl bylo naředěno na 10^{-4} a 10^{-5} , aby byly na miskách vidět jednotlivé kolonie, a poté natřeno na LB misky bez antibiotika. Po povaření je provedeno totéž s druhou částí vzorku.
- Vzorky jsou odebírány v časových intervalech, ihned po přenesení do SM média, po 6, 7, 8, 18, 24 a 48 hodinách.
- Počty kolonií na jednotlivých miskách jsou vyhodnoceny.

4.5.3 Měření optické denzity (OD)

Principem této metody je měření intenzity světelného paprsku před a po průchodu analyzovaným vzorkem. Čím je vzorek hustší, respektive čím je vyšší koncentrace zkoumané látky ve vzorku, tím je paprsek vycházející ze vzorku slabší a tím má vzorek větší absorpční. Měření probíhala na dvoupaprskovém spektrofotometru Shimadzu UV – 1601, na kterém je možno nastavit vlnovou délku paprsku.

- Měření koncentrace bakteriálních buněk probíhá při vlnové délce 600 nm (OD_{600}).
- Měření koncentrace proteinů probíhá při vlnové délce 280 nm (OD_{280}).
- Měření koncentrace nukleových kyselin probíhá při vlnové délce 260 nm (OD_{260}).

Pro zjištění čistoty vzorku NK se používá poměr absorbancí naměřených při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Čisté vzorky mají tento poměr v rozmezí 1,7 – 2,0.

4.6 Práce s DNA

4.6.1 Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli* DH5 α

Izolace plazmidu z bakteriálních buněk byla prováděna pomocí komerční soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy QIAGEN. Touto metodou, takzvanou minipreparací, byla získána plazmidová DNA pro ověření správného vložení konstruktů. Základem metody je adsorpce DNA na silikagel za přítomnosti vysoké koncentrace solí. Volná RNA, proteiny a další intermediáty jsou postupně vymývány zvyšující se koncentrací solí a plazmidová DNA je eluována nízkou koncentrací solí.

Použité roztoky:

Pufr P1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNáza A

Pufr P2: 200 mM NaOH; 1% SDS

Pufr EB: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Pufr N3

Pufr PB

Pufr PE

Provedení:

- Jednou kolonií bylo zaočkováno 10 ml LB média s příslušným antibiotikem. Toto inokulum bylo poté kultivováno přes noc ve 37 °C.
- Narostlá kultura byla centrifugována při 10 000g po dobu 10 minut ve 4 °C. Supernatant byl slit.
- K peletu bylo přidáno 250 μ l pufru P1, byl poté resuspendován a převeden do mikrozkuhavky.
- Dále bylo přidáno 250 μ l pufru P2 a jemným opakovaným převrácením (4 \times – 6 \times) mikrozkuhavky byla tato směs promíchána. Proběhla tak lyze bakterií.

- Přidáním 350 μ l pufru B3 a následným promícháním převrácením byla lyze zastavena.
- Vzniklá sraženina byla centrifugována 20 minut při 14 500g za teploty 4 °C.
- Supernatant byl promíchán a přenesen na kolonku QIAprep. Pomocí centrifugace (12 000g, 4 °C, 1 minuta) prošel skrz kolonku, byl odebrán ze dna mikrozkušavky a tento postup byl zopakován.
- Kolonka s navázanou plazmidovou DNA byla přečištěna 0,5 ml pufru PB a 2 \times 0,75 ml pufru PE.
- Zbytky pufrů byly z kolonky odstraněny pomocí centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím případě.
- Přečištěná plazmidová DNA byla pak eluována z kolonky pomocí 50 μ l pufru EB a následnou centrifugací do čisté mikrozkušavky.

4.6.2 Restrikční analýza

Restrikční analýzou bylo zjišťováno, zda se požadovaný insert úspěšně zaklonoval do plazmidu.

Použité roztoky:

Restrikční endonukleázy, konečná koncentrace 1-2 U/500ng DNA (*Bam*HI, *Xho*I)

10 \times koncentrovaný restrikční pufr (10 \times K)

Provedení:

- Byla namíchána restrikční směs o objemu 10 – 50 μ l, která obsahovala restrikční endonukleázy, restrikční pufr a plazmidovou DNA (obvykle 10 μ l izolované plazmidové DNA z miniprecipitace).
- Směs byla inkubována 90 minut ve 37 °C.
- Poté byla reakce ukončena tepelnou inaktivací 10 minut v 65 °C.
- Následně byla směs puštěna agarózovou elektroforézou a analyzována.

4.6.3 Elektroforetická analýza DNA

K analýze DNA byla použita horizontální elektroforéza v agarózovém gelu. Princip této metody je založen na skutečnosti, že se DNA je v roztoku záporně nabitá a v elektrickém poli putuje k anodě. Pro kontrolu velikosti a pro odhad její koncentrace byl používány hmotnostní

marker – DNA z bakteriofága λ štěpená enzymy *HindIII* a *EcoRI* (velikosti fragmentů v rozmezí 21 226 – 564 páru bazí). Marker byl připravován v naší laboratoři.

Použité roztoky:

Agaróza (0,5 – 2%)

50× TAE (pH 8,0): 2 M Tris-acetát, 50mM EDTA (pH 8,0)

Ethidium bromid (10 mg/ml)

Vzorkový pufr pro DNA: 2,5 mg/ml bromfenolová modř; 2,5 mg/ml xylen cyanol;
30% glycerol; 6 mM EDTA

Provedení:

- Nejprve byla sestavena aparatura na elektroforézu.
- Požadované množství agarózy (hmotnostní jednotky odpovídají objemovým) bylo v mikrovlnné troubě rozpuštěno v pufru 1× TAE na agarózu požadované hustoty.
- Agaróza byla ochlazená pod tekoucí vodou na teplotu asi 50 °C a byl do ní přidán ethidium bromid na výslednou koncentraci 0,5 µg/ml.
- Agaróza byla rychle přelita do elektroforetické aparatury a byl do ní vsazen hřeben.
- Agaróza byla přelita zbylým 1× TAE pufrem a byl z ní vyjmut hřeben a do takto připravených komůrek byly naneseny vzorky DNA ve vzorkovém pufru a hmotnostní marker.
- Po nanesení byly vzorky DNA děleny na gelu za stálého napětí 5 V/cm.
- Gely s rozdělenou DNA byly pak prohlíženy na UV transluminátoru při vlnové délce 320 nm a vyfotografovány fotoaparátem (Olympus).
- U plazmidů byla zkoumána jejich kvalita i kvantita, úspěšnost zaklonování insertů.
- Pokud to postup dále vyžadoval, byly vybrané DNA fragmenty z gelu vyříznuty a následně vyizolovány.

4.6.4 Izolace z gelu

Izolace DNA z agarózového gelu byla prováděna pomocí soupravy QIAquick Gel Extractions Kit od firmy Qiagen. Základem této metody je afinitní chromatografie, kdy se DNA váže na silikagelovou membránu za vysoké koncentrace solí. Eluce DNA je pak vyvolána snížením koncentrace solí, kdy nejprve se odplaví nečistoty, jako zbytky agarózy, enzymy, malé nukleotidy a primery.

Použité roztoky:

Pufr QC: 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% isopropanol (v/v)

Pufr EB: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Pufr PE

Izopropanol

Provedení:

- Z agarózového gelu byl vyříznuta část obsahující požadovanou DNA pro izolaci.
- Dílek gelu byl zvážen a vložen do mikrozkuhavky.
- Ke vzorku byl přidán pufr QG v přiměřeném množství (300 µl pufru na každých 100 mg gelu).
- Směs byla promíchána a inkubována 10 minut v 50 °C. Každé dvě minuty byla směs znovu promíchána, až do úplného rozpuštění.
- Následně bylo upraveno pH roztoku podle přítomného barevného indikátoru. Pokud byla barva roztoku oranžová nebo fialová byl přidán 3 M octan draselný pH 5,0 dokud nebyl roztok žlutý
- Ke směsi byl přidán izopropanol v přiměřeném množství, 100 µl na 100 mg gelu.
- Roztok byl nanesen na kolonku s membránou a centrifugován po dobu jedné minuty při 12 500g při pokojové teplotě. Tento krok byl poté ještě jednou zopakován.
- Na kolonku bylo naneseo 0,5 ml pufru QG a vzorek pak byl centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím případě.
- Dále bylo naneseo na kolonku 0,75 ml PE a vzorek byl centrifugován.
- Kolonka se vzorkem byla zcentrifugována ještě jednou, takzvaně na sucho.
- Supernatant byl slit a kolonka přenesena do nové čisté mikrozkuhavky.
- DNA byla z membrány kolonky eluována pomocí 50 µl pufru EB a následné centrifugace.
- Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla ověřena na spektrofotometru.

4.6.5 Klonování DNA

4.6.5.1 Příprava DNA inzertů

Geny byly amplifikovány metodou PCR pomocí primerů, které nesly vždy na 5' konci oblast obsahující restrikční místa enzymů pro klonování. Tyto primery byly nejdříve navrženy, následně byla provedena PCR. PCR produkty byly nejprve izolovány z gelu, dále byly jejich konce štěpeny restrikčními endonukleázami a ty byly poté tepelně inaktivovány.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Provedení:

- Byla namíchána reakční směs o finálním objemu 50 μ l.
Složení: 10 \times pufr s $MgCl_2$ 5 μ l
10 mM dNTP 1 μ l
primer forward (100pmol/ μ l) 1 μ l
primer reverse (100pmol/ μ l) 1 μ l
templátová DNA:
(plazmidová DNA 1 ng
nebo chromozomální DNA 1 μ g)
enzym Expand High Fidelity PCR systém 0,75 μ l
iH₂O doplnit do 50 μ l
- Směs byla promíchána a vložena do PCR cycleru PTC-200, kde proběhla amplifikující reakce na program TGO. Teplota, při které primery nasedají, se mohla lišit podle použitých primerů.

Program TGO:	<u>počet cyklů</u>	<u>teplota</u>	<u>čas</u>
	1x	95 °C	2'
	1x	95 °C	15''
		56 °C	30''
		72 °C	1'
	5x	95 °C	15''
		52 °C	30''
		72 °C	1'
	24x	95 °C	15'
		48 °C	30''
		72 °C	1'

- Produkty získané touto metodou byly analyzovány elektroforeticky.

4.6.5.2 Ligace

K ligaci byla používána T4 DNA ligáza od firmy Promega o koncentraci 20 U/μl. Enzym ligáza spojuje kohezní konce plazmidů a inzertů za vzniku nových fosfodiesterových vazeb. Tato reakce je energeticky náročná a proto vyžaduje přítomnost ATP v reakci.

V reakcích byly používány již naštěpené a defosforylované plazmidy, připravené u nás v laboratoři.

Provedení:

- Byly namíchány reakční směsi o konečném objemu 10 μl tak, aby obsahovaly:
plazmid a inzert v množstevním poměru 1:5
1 – 5 U/μl ligázy
1× ligační pufr (s ATP)
50 – 100 ng štěpeného plazmidu
- Mikrozkušavky se směsí byly inkubovány 3 – 16 hodin při 16 °C.
- Ligace byla ukončena inkubací po dobu 15 minut v 65 °C.

4.6.5.3 Transformace plazmidu do *Escherichia coli*

Transformace všech kmenů byla prováděna metodou tepelného šoku.

Provedení:

- Zmražené kompetentní buňky uchovávané při -80 °C byly nechány roztát v ledové lázni.
- Ligační směs nebo plazmidy byly rozpipetovány do vychlazených mikrozkušavek a poté bylo připetováno po 200 μl kompetentních buněk. Směsi byly protřepány a inkubovány po dobu 30 minut v ledové lázni.
- Mikrozkušavky byly přeneseny na 90 sekund do termobločku s 42 °C a pak zpět na 5 minut do ledové lázně.
- Do každé zkušavky byl přidán 1 ml LB média. Mikrozkušavky poté byly třepány 1 hodinu v 37 °C v horizontální poloze.
- Buňky byly krátce zcentrifugovány, supernatanty slity a sedimenty byly resuspendovány ve zbytku média, který stekl zpět ze stěn mikrozkušavky.
- Buňky byly natřeny na misky se selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc v termostatu v 37 °C dnem vzhůru.

4.6.5.4 Sekvenační reakce

K ověření úspěšnosti klonování a transformace byla použita sekvenační reakce. Sekvenování probíhalo Sangerovou metodou (za použití dideoxynukleotidů). Vyhodnocení sekvenace bylo provedeno na kapilárním sekvenátoru.

K amplifikaci byl použit systém BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Použité roztoky:

3 M acetát sodný
glykogen
iH₂O
96% ethanol
70% ethanol

Provedení:

- Do mikrozkušavek o objemu 200 µl byl namíchán sekvenační mix a konečném objemu 10 µl.

Složení jedné reakce:	plazmidová DNA z vybraných kolonií	7 µl
	premix – BigDye Terminátor	2 µl
	primer reverse/forward (3 – 10 pmol)	1 µl
	iH ₂ O na případné doplnění objemu	

- Směs byla důkladně promíchána a vložena do PCR cycleru (PTC-200).
- Proběhla reakce (25 cyklů):

<u>teplota</u>	<u>čas</u>	<u>děj</u>
96 °C	10 sekund	tání DNA
45 °C	5 sekund	nasedání primerů
60 °C	4 minuty	polymerace
- Ke vzorku bylo následně přidáno 10 µl 3 M acetátu sodného a 80 µl iH₂O. Vzorek byl promíchán a přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Dále bylo přidáno 5 µg glykogenu (0,25 µl) a vzorek byl promíchán.
- Ke vzorku bylo přidáno 300 µl 96% ethanolu a směs byla opět promíchána.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 20 minut při 17 000g za teploty 4 °C.
- Supernatant byl odstraněn a pelet byl opláchnut 250 µl 70% ethanolu a centrifugován po dobu 5 minut jako v předchozím bodě.

- Pelet byl usušen v exsikátoru, ve vakuu a následně odeslán do sekvenační laboratoře.
- Výsledná DNA sekvence byla zkontrolována pomocí programu EditSeq a ClustalX.
- Bakteriální kolonie obsahující zkontrolovaný plazmid byly případně zakonzervovány do glycerinové konzervy.

4.6.5.5 Tvorba glycerinové konzervy

Konzervy slouží pro dlouhodobé uchovávání vybraných bakteriálních kmenů v -80 °C i po dobu několika let.

Provedení:

- Z čisté bakteriální kultury narostlé z vybrané 1 kolonie v LB médiu bylo odebráno 850 µl a přidáno 150 µl glycerolu.
- Směs byla důkladně promíchána a uložena do -80 °C.

4.7 Práce s proteiny

4.7.1 Exprese a izolace proteinu HelD s kinázovací doménou

Protein HelD byl nadprodukován v *E. coli* (DE3)BL21. Tyto buňky obsahují gen pro HelD protein na plazmidu pET22b pod IPTG inducibilním promotorem. Expresí z tohoto plazmidu se k připravenému DNA inzertu přidá kinázovací doména a histidinová kotva. Izolace proteinu pak může proběhnout na základě afinitní chromatografie. Základem této metody je interakce chelatačního nosiče (nikl-agarózových kuliček) s histidinovou kotvou na proteinu.

Použité roztoky:

Pufr P: 300 mM NaCl; 50 mM Na₂HPO₄; 3 mM 2-merkaptoethanol; 5 mM glycerol; H₂O
100 mM IPTG

2 M imidazol

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Provedení:

- Z glycerinové konzervy bylo zaočkováno 10 ml LB média s ampicilinem (100 µg/µl) a kultura byla nechána růst 12-16 hodin ve 37 °C za stálého třepání.

- Narostlou kulturou byl zaočkován 1 litr čerstvého předeřátého LB média s ampicilinem na OD₆₀₀ 0,03. Následná inkubace probíhala za stálého třepání v 37 °C, dokud nebylo OD₆₀₀ 0,6 – 0,8.
- V takto rozrostlé kultuře následovala indukce exprese přidáním IPTG na finální koncentraci 0,8 mM a inkubace pokračovala další 3 hodiny.
- Kultura byla poté zchlazena a centrifugována při 7700g 15 minut ve 4 °C. Supernatant byl dokonale odstraněn a pelet byl resuspendován v 15 ml pufru P.
- Byla provedena další centrifugace za stejných podmínek, supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 30 ml pufru P.
- Bakteriální buňky byly dále sonikovány, 20× po dobu 10 sekund, vždy s minutovou pauzou v ledové lázni.
- Lyzát byl centrifugován, při 12500g, 25 min a v teplotě 4 °C.
- Supernatant byl ihned přidán k 1 ml nikl-agarózových kuliček. Kuličky byly předem promyty pufrem P.
- Směs byla jemně třepána po dobu 60 minut ve 4 °C.
- Mezitím byla promyta PolyPrep kolonka přibližně 4 ml pufru P.
- Promíchaná směs byla nanášena na kolonku, promyta 30 ml pufru P, poté promyta 30 ml pufru P s přidáním 30mM imidazolem.
- Eluce pročištěného proteinu proběhla 10 ml pufru P s přidáním 400 mM imidazolem. Frakce byly jímány po 1 ml do mikrozkušavek.
- Byl zjištěn obsah proteinů pomocí reakce dle Bradfordové – k 10 µl frakce byl přidán 1 ml činidla a byla sledována změna zabarvení.
- Čistota proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy.
- Vybrané frakce byly dále přečištěny pomocí dialýzy.

4.7.2 Dialýza – pročištění proteinového izolátu

Základem dialýzy je selektivní průchod molekul membránou podle velikosti pórů. Malé molekuly projdou skrz, molekuly větší než je velikost pórů nemohou. Vzorek proteinu je tak pročištěn a rozpuštěn v pufru určeném pro dlouhodobé skladování.

Použité roztoky:

Dialyzační glycerolový pufr: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl;
3 mM β-merkaptoethanol; 50 mM glycerol; H₂O

Provedení:

- Dialyzační kazeta byla nejprve hydratována ve vychlazeném dialyzačním pufru po dobu 5 minut.
- Pomocí injekční stříkačky byl do kazety vložen roztok proteinu. Z kazety byl následně vysán všechen vzduch.
- Dialýza probíhala při teplotě 4 °C za jemného míchání po dobu 6 hodin. Poté byl vyměněn pufr a dialýza probíhala dalších 6 hodin.
- Přечиštěný vzorek byl následně z kazety vysán pomocí injekční stříkačky a přemístěn do mikrozkušavky.
- Protein byl skladován v -20 °C.

4.7.3 Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů v prostředí SDS

K elektroforetické analýze proteinů byla použita metoda vertikální polyakrylamidové elektroforézy v prostředí SDS (SDS PAGE). Jedná se tedy o denaturující elektroforézu. Byl použit zaostřovací a separační gel, kde byly proteiny děleny podle jejich molekulové hmotnosti. Pro standardizování metody byly používány přednalité gely NuPAGE® Novex Bis-Tris Mini Gels od firmy Invitrogen.

Použité roztoky:

Vzorkový pufr NuPAGE® LDS Sample Buffer (4×)

NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel

NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20×)

Coomassie brilliant blue R-250: 25% methanol; 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok: 12 % ethanolu 96%; 7 % kyseliny octové; dH₂O

Provedení:

- Byla sestavena elektroforetická aparatura XCell SureLock™ Mini-Cell.
- 10 µl vzorku bylo smícháno s příslušným množstvím vzorkového pufru a inkubováno při 95 °C po dobu 5 minut (denaturace proteinů).
- Přednalitý gel byl zalit pufrem 1× MES SDS Running Buffer a byl odstraněn hřeben, vzniklé komůrky byly propláchnuty a byly do nich nanесeny vzorky a marker.
- Elektroforéza obvykle probíhala 35 minut při napětí 200 V.

- Gel byl vyjmut z aparatury a barven Comassie brilliant blue R-250 a následně odbarven odbarvovacím roztokem. Poté byl celý gel převeden do digitální podoby.

4.7.4 Nativní polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů

Tato metoda využívá rozdílné molekulové hmotnosti proteinů a zároveň jejich přirozeného náboje, díky kterému se pohybují v gelu různou rychlostí. Tato elektroforéza probíhala za nedenaturujících podmínek, proto je vhodná například pro pozorování vazeb mezi proteiny. Opět bylo použito diskontinuální uspořádání elektroforézy – zaostřovací a separační gel.

Použité roztoky:

10× TBE: 0,9 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 0,9 M kyselina boritá

30% AA-Bis

10% APS, TEMED

NativePAGE™ Sample Buffer (4×) - Invitrogen

NativePAGE™ Running Buffer (20×) – Invitrogen

Provedení:

- Byla sestavena aparatura určená pro nalévání gelů. Čistá skla byla omyta 96% ethanolem a umístěna do držáku.
- Byl namíchán separační gel o hustotě 4 %.

Pro dva gely:	10× TBE	1 ml
	30% AA-Bis	1,33 ml
	dH ₂ O	7,5 ml

- Těsně před nalitím bylo do gelu přidáno 35 µl 10% APS a 4,4 µl TEMEDu. Vše bylo promícháno a ihned nalito mezi skla. Nalité gely byly převrstveny dH₂O a nechány zatuhnout.
- Po utuhnutí byla vrstva vody odsáta a byl namíchán 4% zaostřovací gel.

Pro dva gely:	10× TBE	625 µl
	30% AA-Bis	325 µl
	dH ₂ O	7,5 µl

- Do roztoku bylo přidáno 35 μ l 10% APS a 4,4 μ l TEMEDu. Vše bylo promícháno a ihned nalito mezi skla, do gely mezi zasunuty hřebeny a gely byly nechány zatuhnout.
- Po zatuhnutí gelů byla skla vložena do nádoby pro elektroforézu, zalita vychlazeným pufrům 1 \times TBE a byly vyndány hřebeny.
- Do vzorků byl přidán vzorkový pufr a byly naneseny do takto vzniklých komůrek.
- Elektroforéza probíhala na ledu při napětí 150 V. Průběh elektroforézy byl sledován díky putování bromfenolové modři.

4.7.5 Značení proteinů Proteinkinázou A pomocí $[\gamma - ^{32}\text{P}] - \text{ATP}$

Tato metoda využívá modifikace některých proteinů sedmi specifickými AK, tzv. Kemptide. K těmto AK má afinitu cAMP-dependentní protein kináza (PKA), která je schopná označit tyto AK pomocí radioaktivně značeného fosfátu. Radioaktivní signál byl následně měřen denzitometricky.

Byly použity kolonky PD SpinTrapTMG-25 od firmy GE Healthcare. Tyto kolonky pomocí gelové filtrace od sebe oddělují molekuly s velkou a malou molekulovou hmotností. Používají se pro odsolení, výměnu pufru nebo vyčištění proteinů.

Použité roztoky:

Ekvilibrační pufr: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 12 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 50% glycerol; iH₂O

Pufr pro PKA: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 12 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 25% glycerol

cAMP-dependentní protein kináza (138 U/l)

$[\gamma - ^{32}\text{P}] - \text{ATP}$ (aktivita 9,25 MBq)

kolonky PD SpinTrapTMG-25

Provedení:

- V průběhu tohoto experimentu se pracuje s β zářičem, je tedy nutné používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, brýle, plexisklové štíty, a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- Byl namíchán pufr pro PKA a rozpipetován do mikrozkušavek.
- Byl namíchán ekvilibrační pufr.

- Do mikrozkušavek bylo nanášeno 60 μ l proteinu tak, aby celkový objem byl 100 μ l.
- K směsi bylo přidáno 1,7 μ l PAK a 2 μ l [γ – 32 P] – ATP. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut při pokojové teplotě.
- Kolonka PD SpinTran G-25 byla promíchána, její spodek odříznut skalpelem a kolonka umístěna do mikrozkušavky. Dále byla centrifugována 1 minutu při 800g.
- Kolonka byla promyta 300 μ l ekvilibračního pufru, centrifugována 1 minutu při 800g, umístěna do nové mikrozkušavky. Takto promyta byla ještě 4 \times .
- Kolonka byla umístěna do čisté mikrozkušavky a do jejího středu byl nanášen radioaktivní vzorek.
- Radioaktivně naznačený protein byl eluován centrifugací 2 minuty při 800g.

4.8 Helikázové experimenty – Gel Shift

4.8.1 Testování vazby DNA na HelD

Experimenty k otestování, zda HelD váže DNA, probíhaly s radioaktivně značenou DNA, a byly vyhodnocovány pomocí nativní PAGE elektroforézy pomocí takzvaného „Gel shiftu“, viditelného posunu na gelu.

4.8.1.1 Příprava radioaktivně značené DNA

Nejprve byl radioaktivně naznačen jeden z primerů do následující PCR. Značení probíhá T4 polynukleotid kinázou (T4 PNK), která je schopná přidat na 5' konec DNA radioaktivní fosfáty. Radioaktivní signál byl následně měřen denzitometricky.

Provedení:

- V průběhu tohoto experimentu se pracuje s β zářičem, je tedy nutné používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, brýle, plexisklové štíty, a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- Jedna reakce o finálním objemu 10 μ l obsahovala:

[γ – 32 P] – ATP	3 μ l
10 \times PNK pufr	1 μ l
T4 PNK	1 μ l
primer	1 μ l
iH ₂ O	4 μ l

- Reakční směs byla promíchána a ponechána inkubovat po dobu 60 minut v 37 °C.
- Směs byla následně přečištěna od nezainkorporovaného [γ – ^{32}P] – ATP pomocí soupravy QIAgen nucleotide removal kit od firmy QIAGEN a přečištěná DNA byla eluována do 100 μl .
- S radioaktivně naznačeným primerem byla provedena PCR (viz kapitola 3.6.5.1). Templátem byla plazmidová DNA plazmidu p770.
- Radioaktivní PCR bylo opět přečištěno pomocí soupravy QIAgen PCR purification kit.
- Všechny kroky byly prováděny i paralelně s neradioaktivním ATP, byla pak změřena koncentrace této neradioaktivní DNA a na jejím základě vyvozena koncentrace DNA naznačené.

4.8.1.2 Vazba DNA

Do reakce se ve vhodném pufru dává pouze protein a radioaktivně naznačená DNA. Po proběhnutí se vzorky analyzují na nativní PAGE elektroforéze. Volná DNA doputuje v gelu dále než komplex DNA:HelD a vytvoří na gelu proužek v jiných oblastech.

Použité roztoky:

radioaktivně značená DNA

zásobní roztok HelD

10 mg/ml BSA

Dilution buffer (DB): 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl; glycerol 50%

STOP pufr: 95% formamid; 0,05% bromfenolová modř; 20 mM EDTA (pH 8,0);
0,05% xylene cyanol

10 \times TBE: 0,9 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA pH 8,0; 0,9 M kyselina boritá

30% AA

10% APS, TEMED

Provedení:

- V průběhu tohoto experimentu se pracuje s β zářičem, je tedy nutné používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, brýle, plexisklové štíty, a pracovat ve vyhrazeném prostoru.

- Nejprve bylo potřeba zjistit množství radioaktivně značené DNA puštěné na gel, aby vytvořila jasně definovaný proužek vhodný k dalšímu vyhodnocování. Bylo titrováno množství DNA od 100 fmol po 10 pmol.
- Samotná reakce k otestování vazby probíhala v 10 μ l. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo rozpipetováno příslušné množství DB a zvyšující se molární poměr DNA a HelD; 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 a 1:12. Vychází se ze zásobního roztoku proteinu, který se příslušně ředí. Jako negativní kontrola bylo použito BSA a denaturovaná HelD, které DNA určitě nevážou.
- Směs byla promíchána a inkubována 15 minut ve 30 °C. Po této době byla stopována přidáním 5 μ l STOP pufru.
- Vzorky byly analyzovány na nativní polyakrylamidové elektroforéze, v gelu o hustotě 4 %.
- Gel byl poté usušen a vložen do expoziční kazety, která obsahuje citlivou fólii, která absorbuje radioaktivní záření.
- Primárním výsledkem byl obraz gelu se zřetelně ozářenými proužky, odpovídající analyzovaným vzorkům. Intenzity jednotlivých signálů byly měřeny na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One.

Helikázová, rozplétací, aktivita HelD byla testována na 4 různých dvouvláknových substrátech. Jedno vlákno bylo radioaktivně naznačené. Pokud by HelD měl afinitu k substrátu, byl by na nativní PAGE elektroforéze pozorován posun od oblasti, ve které putuje dvouvláknová DNA, k oblastem, ve kterých putuje DNA jednovláknová. Jednotlivé jednovláknové DNA řetězce byly objednávány u externí firmy (Eastport, ČR).

Použité roztoky:

Provedení:

- V průběhu tohoto experimentu se pracuje s β zářičem, je tedy nutné používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, brýle, plexisklové štíty, a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- Jedno vlákno DNA, oligonukleotid, bylo naznačeno [$\gamma - ^{32}\text{P}$] – ATP stejně jako v kapitole 3.8.1.1 a následně přečištěno.
- Do mikrozkušavky bylo namíchána směs o finálním objemu 10 μl .

Složení reakce:	10 \times AB	1 μl
	radio-značený oligonukleotid	8,5 μl
	neznačený oligonukleotid	0,5 μl
- Směs byla promíchána a vložena na PCR cycleru PTC-200 a byl puštěn program, kdy v průběhu 90 minut klesá teplota směsi z 95 $^{\circ}\text{C}$ na 5 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 1 $^{\circ}\text{C}$ za minutu.

4.8.2.2 Helikázové experimenty

Použité roztoky:

radioaktivně značená DNA

zásobní roztok Held

20 mM ATP

1 mM DTT

25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM MgCl_2

10 mg/ml BSA

iH_2O

Dilution buffer (DB): 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl; glycerol 50%; 1 M KCl

STOP pufr: 95% formamid; 0,05% bromfenolová modř; 20 mM EDTA (pH 8,0);

0,05% xylene cyanol, 100 mM neradioaktivní oligonukleotid

10 \times TBE: 0,9 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA pH 8,0; 0,9 M kyselina boritá

30% AA

10% APS, TEMED

Provedení:

- V průběhu tohoto experimentu se pracuje s β zářičem, je tedy nutné používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, brýle, plexisklové štíty, a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- Reakce probíhala v různých koncentracích HelD – finální 50nM a 150nM. Vychází se ze zásobního roztoku proteinu, který se příslušně ředí.
- Byla namíchána směs o finálním objemu 5 μ l, kromě DNA a HelD.

Složení jedné reakce:	25mM Tris-HCl	0,0625 μ l
	10mM MgCl ₂	0,05 μ l
	20mM ATP	0,25 μ l
	1mM DTT	0,05 μ l
	10 mg/ml BSA	0,05 μ l
	iH ₂ O	4,2375 μ l

- Reakční směs byla připravena pro odpovídající počet reakcí a následně rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek, kam byla přidána radioaktivně značená DNA.
- Reakce byla iniciována přidáním 1,5 μ l HelD příslušného ředění, nebo HelD denaturované, jako negativní kontrola.
- Reakce probíhala 15 minut ve 37 °C a poté byla reakce stopována 10 μ l STOP pufru. STOP pufr obsahuje nadbytek neradioaktivního oligonukleotidu, jehož radiativní varianta je použita v reakce, aby se zamezilo zpětnému spojení dvouvláknových helikázových substrátů rozpadlých na jednotlivá vlákna. Směs byla promíchána a uložena na led.
- Produkty reakce byly analyzovány pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy, v gelu o hustotě 15 %.
- Gel byl poté usušen a vložen do expoziční kazety, která obsahuje citlivou fólii, která absorbuje radioaktivní záření.
- Primárním výsledkem byl obraz gelu se zřetelně ozářenými proužky, odpovídající vzorkům. Intenzity jednotlivých signálů byly měřeny na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One.

4.9 Transkripční experimenty

Transkripční experimenty byly prováděny s holoenzymem RNAP z *B. subtilis*. RNAP i podjednotka σ^A byla připravena v naší laboratoři a izolována pomocí afinitní

chromatografie. Tento holoenzym byl použit pro transkripci *in vitro* z plazmidu p770 s promotorem Pveg.

Při reakci byl použit radioaktivně značený nukleosid trifosfát: $[\alpha - ^{32}\text{P}] - \text{UTP}$. ^{32}P je β zářič s poločasem rozpadu 14,3 dne. Záření vniklé rozpadem UTP zabudovaného do řetězce RNA je absorbováno pomocí absorpční folie. Množství produktu transkripční reakce bylo měřeno denzitometricky pomocí phosphoimageru. Transkripty vznikající transkripcí jsou vždy stejně velké, proto poměr intenzity záření odpovídá jejich množství.

4.9.1 Určování aktivity jednotlivých proteinů na promotoru Pveg

Transkripce se provádí za zvyšující se koncentrace zkoumaného proteinu rekonstituované s RNAP, která má tento protein deletovaný, zatímco koncentrace ostatních složek je v reakci konstantní. Množství produktu transkriptu tak přímo odpovídá aktivitě RNAP (míře transkripce) ovlivněné daným proteinem. Množství vzniklého transkriptu se po nativní elektroforéze měří pomocí phosphoimageru. Z relativního vynesení pak můžeme určit, jestli a jaký vliv má daný protein na RNAP a na TNX. Jako negativní kontrola se používá denaturovaný protein, který tak ztrácí svou funkci, ve stejných molárních poměrech.

Použité roztoky:

20× koncentrovaný transkripční pufr: 800 mM Tris-HCl (pH 7,9); 20 mM DTT;
200 mM MgCl₂

20 mM ATP, GTP, CTP

1 mM UTP

$[\alpha - ^{32}\text{P}] - \text{UTP}$ (aktivita 18,5 Mbq)

zásobní roztok plazmidu p770 100 ng/l

1 M KCl

iH₂O

zásobní roztok RNAP $\Delta\delta\Delta$ HelD z *B. subtilis* (30nM)

zásobní roztok HelD

STOP pufr: 95% formamid; 0,05% bromfenolová modř; 20 mM EDTA (pH 8,0);
0,05% xylene cyanol

10× TBE: 0,9 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA pH 8,0; 0,9 M kyselina boritá

7% AA

10% APS, TEMED

Provedení:

- V průběhu tohoto experimentu se pracuje s β zářičem, je tedy nutné používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, brýle, plexisklové štíty, a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- RNAP $_{\Delta\delta\Delta}$ HelD byla rekonstituována s podjednotkou σ^A v molárním poměru 1:10 tak, aby byla RNAP plně satureována, po dobu 15 minut v 30 °C.
- Transkripce probíhala v molárním poměru RNAP a HelD 1:0; 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 a 1:16. Vychází se ze zásobního roztoku proteinu, který se příslušně ředí.
- Byla namíchána transkripční směs o finálním objemu 10 μ l, kromě RNAP a HelD.

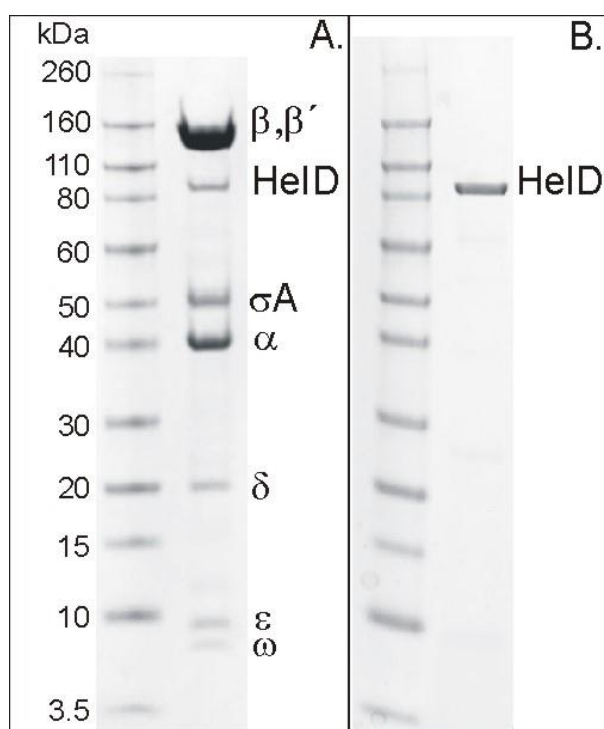
Složení jedné reakce:	20 \times transkripční pufr	0,5 μ l
	20mM ATP (finální koncentrace 200 μ M)	0,1 μ l
	20mM CTP (finální koncentrace 200 μ M)	0,1 μ l
	20mM GTP (finální koncentrace 200 μ M)	0,1 μ l
	20mM UTP (finální koncentrace 10 μ M)	0,1 μ l
	[α – 32 P] – UTP	0,1 μ l
	plazmidová DNA	0,06 μ l
	iH ₂ O	90,73 μ l
	10 mg/ml BSA	0,1 μ l
	1M KCl	1,5 μ l

- Transkripční směs byla připravena pro odpovídající počet reakcí a následně rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek (8 μ l do každé) a předeřáta na 30 °C.
- Reakce byla iniciována přidáním 1 μ l RNAP a 1 μ l HelD příslušného ředění, ve zvyšujícím se molárním poměru.
- Transkripce probíhala 15 minut ve 30 °C a poté byla reakce stopována 10 μ l STOP pufru. STOP pufr obsahuje formamid, který denaturuje RNAP a chelatační činidla vychytávající Mg²⁺ ionty nutné pro transkripci. Směs byla promíchána a uložena na led.
- Produkty transkripce byly analyzovány pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy, v gelu o hustotě 7 %.
- Gel byl poté usušen a vložen do expoziční kazety, která obsahuje citlivou fólii, která absorbuje radioaktivní záření.

- Primárním výsledkem byl obraz gelu se zřetelně ozářenými proužky, odpovídající transkriptům. Intenzity jednotlivých signálů byly měřeny na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One. Velikost signálu byla určena po odečtení pozadí.
- Výsledky byly zpracovány a vyneseny do grafu pro přehlednější znázornění pozorovaného efektu.

5 Výsledky

Při izolacích RNAP z *B. subtilis*, potřebné pro další experimenty, bylo v naší laboratoři objeveno množství proteinů, které s RNAP kopurifikovaly, což naznačuje jejich vazbu na RNAP. Nejvýraznější z těchto proteinů se na SDS elektroforéze objevoval v oblasti přibližně 90 kDa (obrázek 13). Pomocí hmotnostní spektrometrie byl tento protein určen jako HelD. Tento protein je tedy potenciálním vazebným partnerem RNAP. RNAP je klíčovým enzymem bakteriální transkripce a proto jsme se rozhodli charakterizovat protein HelD a jeho vliv na RNAP samotnou a transkripci.



Obrázek 13: HelD kopurifikuje s RNAP.

A Izolovaná RNAP na základě afinitní chromatografie pomocí 10 histidinů na N-konci podjednotky β' . Na SDS elektroforéze jsou vidět podjednotky RNAP a proužek, který byl charakterizován jako HelD.

B Izolovaná vyčištěná HelD na základě afinitní chromatografie pomocí šesti histidinů na N-konci proteinu.

Jako marker byl použit Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard. (Korelusová et al., rukopis v přípravě).

5.1 Experimentální strategie

- Shromáždění základních informací o proteinu HelD pomocí bioinformatických charakteristik *in silico*.
- Porovnání růstových křivek kmenů *in vivo* za různých podmínek. Vliv delece genu se obvykle nejvýrazněji projeví v limitních stresujících podmínkách, kdy bakteriální buňka nemá všeho dostatek a musí se rychle adaptovat na změny

v prostředí. Kmen s deletovaným *yvgS* (v některé literatuře i *helD*) by tak měl být znevýhodněn a to by se mohlo projevit i na růstové křivce.

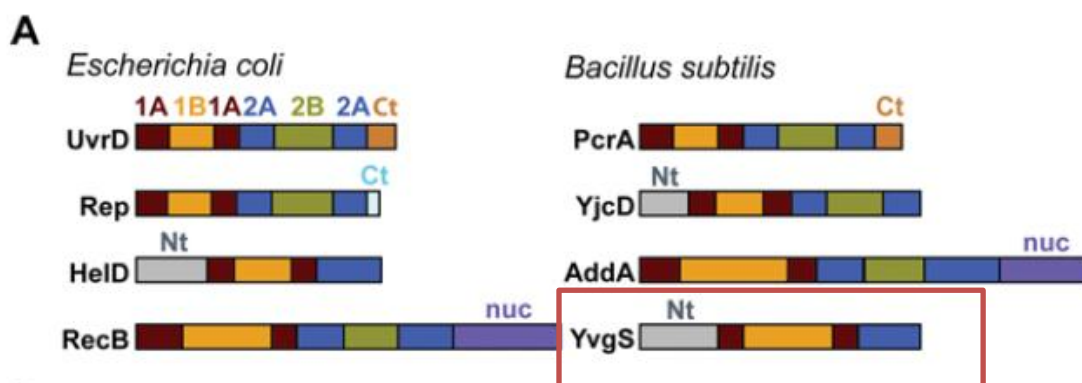
- Porovnání růstových křivek divokého kmene s kmenem s delecí buď v genu pro HelD nebo pro podjednotku δ , nebo v kmeni s dvojitou delecí. Z transkripčních experimentů *in vitro*, prováděných u nás v laboratoři, byla předpovězena spolupráce HelD a podjednotky δ . Tento fenomén měl být otestován také *in vivo*.
- Příprava modifikované varianty HelD s kinázovací doménou na svém N-konci na potvrzení a vizualizaci vazby HelD na RNAP.
- Ověření schopnosti HelD vázat DNA a také ji rozplétat, vzhledem k tomu, že HelD spadá podle svých charakteristických motivů do helikázové rodiny.
- Určení vlivu HelD na transkripci *in vitro*. Experimenty byly prováděny na promotoru *Pveg* plazmidu p770, viz kapitola 4.4.

5.2 Bioinformatické charakteristiky *in silico*

5.2.1 Základní charakteristika

Protein HelD je kódovaný genem *yvgS*. Skládá se ze 774 AK a má velikost 89,95 kDa. Teoretické pI je 6,28, experimentálně zjištěné pI proteinu HelD v nativním stavu je ~ 7.1 (Koval, T., osobní sdělení).

Bylo předpovězeno, že se HelD skládá ze tří domén – DNA vazebné, ATP vazebné a rozplétací, viz obrázek 14. Na základě sekvence bylo předpovězeno, že HelD by mohla být DNA helikáza, rozplétající DNA ve směru 3'–5', spadající do rodiny DNA helikáz UvrD/Rep.



Obrázek 14: Struktura HelD a ostatních helikáz z rodiny UvrD.

Jednotlivé domény jsou stejně barevně značeny. Domény 1A, 2A, 1B a 2B jsou charakteristické pouze pro UvrD rodinu, zatímco zbylé domény se nacházejí ve všech helikázách. Délky jednotlivých domén zhruba odpovídají realitě. Nt znamená N-koncovou doménu, Ct C-koncovou. (Dillingham, 2011)

5.2.2 Homology HelD

Chtěli jsme určit, v jakých bakteriálních druzích se nacházejí homology proteinu HelD.

Sekvence helikázy HelD z *B. subtilis* byla použita k hledání podobných sekvencí pomocí non-redundant PSI-BLAST. Vybrané sekvence (viz tabulka 2) byly použity k tvorbě srovnání pomocí CLUSTALW2. Ve výsledném srovnání (viz obr. 15) byla zvýrazněna sekvenční identita (černé stínování), pokud se stejná aminokyselina vyskytovala u 50 a více procent sekvencí; sekvenční podobnost (šedé stínování), pokud se podobná aminokyselina vyskytovala u 50 a více procent sekvencí pomocí BOXSHADE 3.21.

Nad sekvencemi jsou vyznačeny helikázové motivy podle (Dillingham, 2011). Pod sekvencemi jsou červenou hvězdičkou vyznačeny aminokyselinové zbytky, které u HelD pravděpodobně interagují s ATP (založeno na částečném modelu terciální struktury HelD vytvořeném na I-TASSER serveru, s následnou predikcí vazebných míst podle PcrA helikázy, PDB ID: 1QHG). Zeleným křížkem jsou pod sekvencemi vyznačeny aminokyselinové zbytky HelD, u kterých je předpokládána interakce s DNA (založeno na částečném modelu terciální struktury HelD vytvořeném na I-TASSER serveru, s následnou predikcí vazebných míst podle komplexu helikázy PcrA s DNA, PDB ID: 2PJR a komplexu Rep helikázy s DNA, PDB ID: 1UAA). Čísla v hranatých závorkách udávají počet vynechaných aminokyselin v zobrazeném srovnání.

Tabulka 2: Bakteriální druhy a přístupová čísla Genbank sekvencí použitých pro srovnání

Bakteriální druh		Čísla Genbank sekvencí
<i>Bacillus subtilis</i>	subsp. <i>subtilis</i> RO-NN-1	YP_005558353.1
<i>Clostridium botulinum</i>	NCTC 2916	ZP_02612765.1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	NP_784632.1
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MC2 155	YP_886528.1
<i>Actinobacterium</i>	PHSC20C1	ZP_01130061.1
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032	BAB98766.1
<i>Deinococcus radiodurans</i>	R1	(Cao a Julin, 2009)
<i>Escherichia coli</i>	K-12	NP_415482.1

Závěr: Hledání homologů HelD identifikovalo tyto proteiny u bakterií z kmene *Firmicutes*, G+. V jiných kmenech se homology HelD nalézt nepodařilo. Dalším srovnáním sekvencí helikáz z různých bakteriálních druhů byla potvrzena konzervovanost helikázových motivů, jinak se vybrané helikázy často lišily.

B. subtilis 31 TSAGLKHDIIGLRKSFWEVKNFDDAHEALLETMAS [6] ILISRFQNHRRMQLKRIHQKK SPYFGRIDFIENGFAE [3]
C. botulinum 29 NLKEFKKDAIETQREIMDWGVS--VSLANGLEQVVD [6] TWKIQRSHEFTKLEEKYERVLL SYFGRMDFIENGEEK [3]
L. plantarum 29 QITRSEKQADIKRDLNNINIKTSTYEGMETGLS [6] MDDRQNSWKHATQOSTLKDEK NAYFRIDFHEHTEPK [3]
M. smegmatis 8 DELQSERDYVAGLYARLDAERAQSORRYAALREHGG TAVERRDAEVRALAKDIARLNVAEN GUCFGRIDT--IDFAR
Actinobacterium sp. 4 SELAREBDYHGLYERLISLEAAQQLDAEVRISAPG [4] NRSRRDAFARIYEDRVGLREIDE RLAFGRILEBEDSS [4]
C. glutamicum 47 IALSQEQAYVDVLEGRLLDEVARSNQRSEVMKDVDP [6] ALVRRTEYHGLNEKLDRLNLQAL GLVEGRIDVESEADA [12]
D. radiodurans 36 LIFMSLAEPVKTHPDEEASSHLAGTQAMIRQLGS [10] DETSVTMADTAEHAAMLSVHYH QRYFGSLKVRVGRQ [1]
E. coli 7 TLGKRLAQHPHYDRAVILNAGIKVSGDRHEYLIPFNQL [7] GLVWGELFEVLDPDEKVVRLHGTW [3] QRYFHHLLDAHMRWVG [4]

B. subtilis 117 IYIGLASCLEDEK [2] HELIYDWRAPSSLYINYSPKAEYEVPGETT--EGEVVLRQFMKGTIKAMENTDY [3] DEMLIQEVLSHHS
C. botulinum 113 YYIGISNLINEN [1] DELIYDWRAPSSMEFYDYEIGEANKYKCEGRY--NGKLTIKRQYKINNGITIKYMFBSNL [3] DEMLIQDILGKST
L. plantarum 115 IYIGLSSFSSTP [1] HELIYDWRAPSSLYDGGGHVHTYQTPDEQ--TVNKKLKRQIMWENGLVTVPTDE [3] DSNLILEVLDEKS
M. smegmatis 83 IYIGRLGHRDRD [3] EELLIDWRAPVAPRPFYVVAANPENMRRRQFHTLGRKVDFTDEILGRPTGAEHADTN DAALLAANAPR
Actinobacterium sp. 89 RYIGRIGRERD [1] OSLLIDWRVPQKRAFYQAAATPLGARARHLSRGRDIAVRIIDDELPDSEILDSDAST [2] BALMASTIADR
C. glutamicum 142 RYIGRMGHDVRE [3] RLILIDWRSPVAPRPFYLAATVYSPEGVHILRHITRGRGVVTGVDDVLTGEMADVIEQGG [3] ESTIHOALEQAR
D. radiodurans 124 IYIGKHAERFVVG [1] PHHVMDSDEVGSIFYSDADWVPRGSGQLRRRQDVAQKALRYTLDYDDEQGD [4] DEMLIRLKEQS
E. coli 98 IASGVLRQQLL [3] RTGENKWLTRQQLSGVQQLRQALSALPLPVNRLFEFTDNCLEAWRKCCQAMKDIESRL [3] QAYTEAVLITEYA

motif 1

B. subtilis 203 DTOMKNIVSTIQKEQNQLITRNEKSKILLVQGAAGSGKTSALQRVAVILLYRRHG [2] DAGQVLFSPNFIENSYVSSVLPETGEENMEQAT
C. botulinum 198 DSKMNAIVTTIQREQNKLIRNEEYKNLVQGPAGSGKTSVALHRLVYLLYKHRD [2] SPQNVTFSPNDIENDYISNVLPLUGEDNMQOT
L. plantarum 200 DVMKSIIVTTIQEQNTITRDTSSDLEVQGAAGSGKTSVLRVAVILLYRRG [2] TAGQVILFSPNLENDYINQVLPETGEQNVQMT
M. smegmatis 169 GEGMRDIVATTIQEQDQTRLDHTGVTEEGPGTGKTVVALHRAVILLYTYRK [2] ERHGVLVWGPPTPAFLHIGVLPSSGSDAVEMT
Actinobacterium sp. 175 TGRMGDIVATTIQEQDATTRESELGGALVVOGCPGLGKTAVALHRAVILLYSHRE [2] STSGVLVWGPSSRSRLRYEAVLPSSGETGVLAS
C. glutamicum 231 SGHMNIYETIQEQDELTRDITTRGVVVOGCPGLGKTAVALHRAVILLYTWRD [2] AKSGVLITGPKTELEYISHLPELGETGVLSI
D. radiodurans 212 TAGMRDVEELIQPEQNEANRFPAGTPVITQGAAGSGKTIQFHRILAMTSGDRG [4] RPEACWVIMENRVLAAYARILPELIGIGVSVIT
E. coli 187 LFFRQVESPINPAQARAIVNGEHSILVLAG--AGSGKTSVLVARAGLILARGEA [1] PEQILLAFGKKAEMDERIRERHHTEDITART

B. subtilis 293 EQEYIE [16] EYCLTETKGGDFPTRAGITWKAGISQQFINEYVTLSSSEGMIKNNIIFRGQKLITKEQOSYFYS [38] AEILDKED
C. botulinum 288 EKEYMH [16] EYILVSKKDGAYEKRLNNIKFKSSMEFNILKAYGYLEKMDRNETDITERGDIISSKDELELFK [34] EELKNSGN
L. plantarum 290 YEQYAS [8] ETLIQRETENTPOMAKITKIEGSLAFENAVTTYRGLLEQADMERNITLINDEYIISREKISYYS [38] VODISREB
M. smegmatis 259 PGDFVP [28] VADRLPELSEPIPLDSYDVTMRIDAEITAKWARDEKRTGLPHNEARAEFVDVTVVTERAVARIGR [35] WPILTPED
Actinobacterium sp. 265 LGQLFP [28] VRSRQVAPRETQRENGEILIDVPADILRGAMQKMDSHKPNILARVAFNKAATAALSRMLADQLRS [30] WPIPLSPHK
C. glutamicum 321 VGELEFP [28] VKRAYQVLEPKEITIVSVDGEIISIDKTVAKSRTRRRARQSHNSARPIFREHLEQOLAHQWQOTIGA [34] WPELSPQD
D. radiodurans 304 PEAWAT [15] SILITDIDNGRRALLAWRRAKLIGDARMVDVRIHLMN--KFGAALTGQSLQENIEVAGRGILTFSIS [23] FRLVLEE
E. coli 275 HALAL [15] HIQQGSKKVPIVSKLENDTARHLEFLAEWRKCCSEKKAQAKGRQWLTEEMQWSPED----- GNFWDDEK

B. subtilis	428	YLDVYKRLQERKRFSESTENDYQREQLLAATIVKKAFKPLKQAVRLAFLDV	[34]	KILYEDAPETLYMQDLIE	GRKNTKIKHL	
C. botulinum	419	YLDNVEIMERSINIVKDEIKDIYHEINRMTEFLVDYKRLFENIEFFLTKSN	[20]	KINVEDQPLYLKGALE	DEKTESEIKYV	
L. plantarum	417	INOLYGNQPREFKNGDKKEKFLARKIVQRLGKARTQIVRNRELINMQYHFF	[34]	HSLTYSAYMYLHDLMT	GRFGQDIRHY	
M. smegmatis	403	VLAQLYTSHERLRAAG---APEC---LIRADGEAMTVSDVPLDELVDLGRN	[42]	ILDAEELADRFKEQDNRE	[5]	AADFEWTYGHV
Actinobacterium sp.	404	LINDLYARENWLRSITPTMAPEQFALLIRERDVFTISVALDEAAELGDEV	[33]	MIDAEETLADGFEVSAERA	[6]	AADRSWTYGHIL
C. glutamicum	464	VHDDLISBERINVAAGYDEETKSALRGELPMAPSDAALLDELALIGLPL	[48]	VIDAEETLAQROTVDNKT	[5]	QADHKWAYGHV
D. radiodurans	421	AVSRLVRPEEEASVRRLSKPLTLTGRIFASTPTVTEARLLADADALVAS	[25]	HADVTELPTMLAVQAFTG	[5]	VERTELEPEDHY
E. coli	348	QORLASRLRWVSLMRMHGGAQAEVYASAPEELRDIFSKRLKIMAPILTKHWK	[7]	AVDFSGLIHQAVILLEKG	--	RISPMWKHL
motiv 2						
B. subtilis	544	FIDEAQDYSPEQMAYRSLFPAASYTLGDLINQSYAHTI-HGDQR-MDAQFEA	[2]	AEYVRLKRTYRSTRQIIEFTKAMLDGADIEPEN		
C. botulinum	523	IIDEAQDYPIQYELFSOLFHNAMTILGDLHQSNPFMN-VGQYSNISNVEPK	[2]	TCINILTKSYRSTMETEFSRLINKKITDQWE		
L. plantarum	533	FIDEIQQDYNAFQLAFIKESFPQARETLGDLNQAFITKENSLSLINELATLEDP	[2]	TRVVQLTKSYRSTQQTETFTKEILVNGEAVTAFD		
M. smegmatis	526	VVDEAQELSEMMDRLLMERQCPRRSETVGDIAQRRSPAGA--RSWGAMLDSVVP	[2]	WVYKSLSVNYRIPALIVAAVAALAEFAPDATP		
Actinobacterium sp.	525	VVDEAQELSPQWRLLAKRNPLKSFETVGDVAQSAQAAA--TRWDTALADHVQ	[2]	WRLEELTVNYRTPSQIVAAEAVALLAHVSI TPS		
C. glutamicum	599	IVDEAQELSPLEWRWYERSPSRWMTLVGDIAQTSPPAGV--DMAESLMEVYE	[2]	FRHHELTNYRIPALISVANELLQOINPDIAPA		
D. radiodurans	533	VIVDEAQDYSPLIALALRAARPHVTALGDLINQSGHGKYG-PSKQODVQDOLPG		AQVITLSRYRSTRQITETEGARLAETYNRAQVQ		
E. coli	435	IVDEFQDIQSORALLAALRKONSCQTLFVAGDWMQAIYRFSQAQMSLTTFHE	[4]	GERCDLDTYRFNSRLGEVANRFLQONPGQLKRP		
motiv 3						
B. subtilis	632	RSGEMLVVKTEGHESLQCKLAQELGRLKKKGHEITIAVCKTAQOCTQAHAMSEY	[15]	GVQVLPVYTLAKG----	LEFDVAVLY	
C. botulinum	612	RSQDRPIVIGFPNEPALIKERLIKIKYKKGYSIGITRTIKEAEVHSFLTKDK	[15]	DTIVIPAYTLAKG----	LEFDVAVLY	
L. plantarum	623	RQGDLEVVVTPNEAGVDQVVDLAMDSE-RDTTALIGKSLAECAITKALKAR	[16]	GVIVPSTLAKG----	LEFDVAVLV	
M. smegmatis	614	[3] RACGVAPWARQVTPDDIASALAEFV--SEAGREGTSVIGPDPVPGVTP----		-----	LEFDVAVLV	
Actinobacterium sp.	613	[3] RESPMVAVTTIAAPENROASVVEAVRVDREISADGTIAVIVSESITADVVSALKTA	[14]	PAVITPRESKG-----	LEFDVAVLV	
C. glutamicum	687	[3] RESGREVNLPLDA--LSAVVSL--REDSQRTIAVTSRRHESDFY----		-----	LEFDVAVLV	
D. radiodurans	620	[3] REGAEVQRYEGDERRALIAQAKDA---QAAGHTINIAVTRGADADRISAEIRDF	[16]	GVIVPSTLAKG----	LEFDVAVLV	
E. coli	527	[3] LTNQDKKAVTLLDSQDALDKLSGYAKPEERILLARYHMRPASLEKATRWTP	[16]	ADYVILIVGLQEGSDGFPAARESIMEE		
motiv 4						
B. subtilis	724	PASKEHYT				
C. botulinum	704	NAGDENYSC				
L. plantarum	715	NANQENYQR				
M. smegmatis	680	PERILADG				
Actinobacterium sp.	707	EPQRIVDRI				
C. glutamicum	752	DPAGIVEES				
D. radiodurans	713	GANTTYDE				
E. coli	629	ALLPVEDE				
motiv 5						
B. subtilis	724	EHERRLLYTACGRAMHMLTPTTGEASPTAV	[9]	C-konec		
C. botulinum	704	EEERLLYTACTRALHLICLYSGKVTPIEGS	[7]	C-konec		
L. plantarum	715	EDERQLLYTICRAMHELITVAVGSLSPILARV	[12]	C-konec		
M. smegmatis	680	PRGAELLYVATRAQTORTGLVYRDALPQALAGL	[15]	C-konec		
Actinobacterium sp.	707	ARGAALLYVATRAQTORTLSTVATNGLPEGPTP	[1]	C-konec		
C. glutamicum	752	PQGIQDLYVATRAQTSLIIGE-----		C-konec		
D. radiodurans	713	EYERRLLYVAAARALHMLGAVSGAELHPLVR-		C-konec		
E. coli	629	AEERRLMYVATTRARHWADENKENPSPFVEI	[12]	C-konec		
motiv 6						

Obrázek 15: Srovnání AK sekvencí helikáz z různých bakteriálních druhů.

5.3 Fenotypové srovnávací testy *in vivo*

Růstové křivky jednotlivých kmenů, kmenu divokého a kmenu s delecí genu *helD*, byly porovnávány v médiu bohatém, v médiu minimálním, v médiu s různými koncentracemi soli a v médiích s různými zdroji uhlíku. Dále byla sledována adaptace kmenů na ethanolový stres a porovnávána délka lag fáze jejich růstové křivky po nasazení do čerstvého média.

Byly používány kmeny LK809 (divoký kmen) a LK782 (Δ HelD), nebo LK917 (divoký kmen) a LK947 (Δ HelD). Genotypy jsou uvedeny v kapitole 3.3.

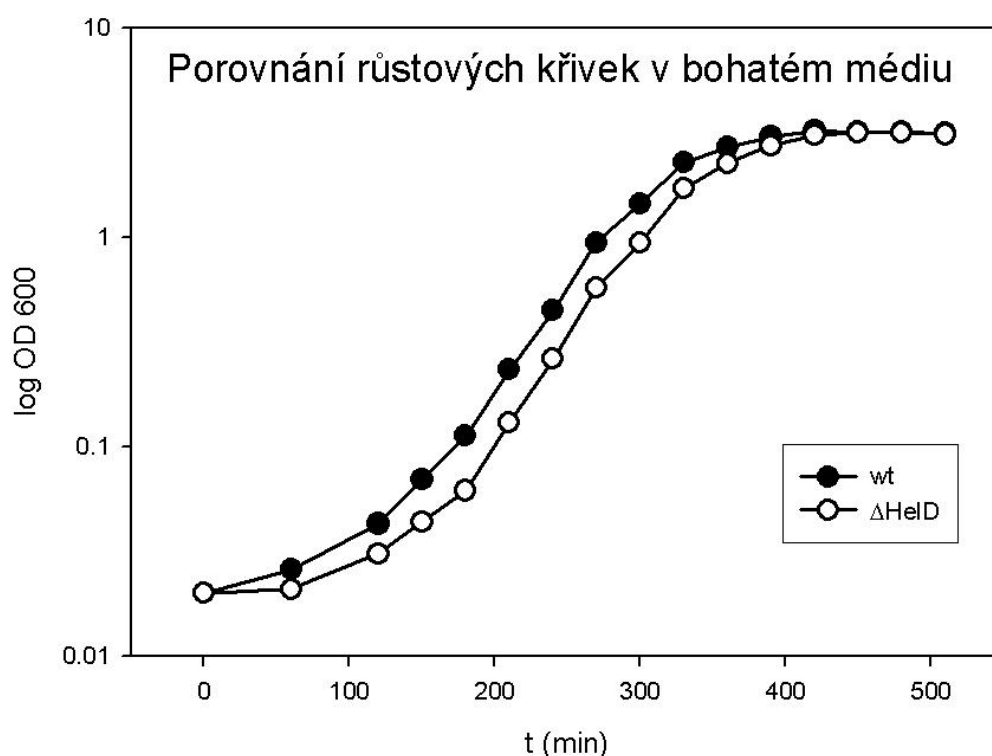
Růsty byly prováděny v následujících médiích: LB médiu; definovaném MOPS médiu; CH médiu a SM médiu. Složení jednotlivých médií je uvedeno v kapitole 3.2.

Všechny růstové experimenty byly sledovány měřením OD při vlnové délce 600 nm v průběhu růstu bakteriální kultury.

- **Bohaté médium (MOPS 20 AK)**

Bakteriální kultury (divoký kmen LK809 a kmen Δ HelD LK782) byly pěstovány v definovaném MOPS médiu se všemi 20 AK při teplotě 37 °C za stálého třepání.

Výsledky byly vyneseny do následujícího obrázku 16.



Obrázek 16: Porovnání růstových křivek divokého kmene a kmene s delecí *helD* v tekutém MOPS 20 AK médiu.

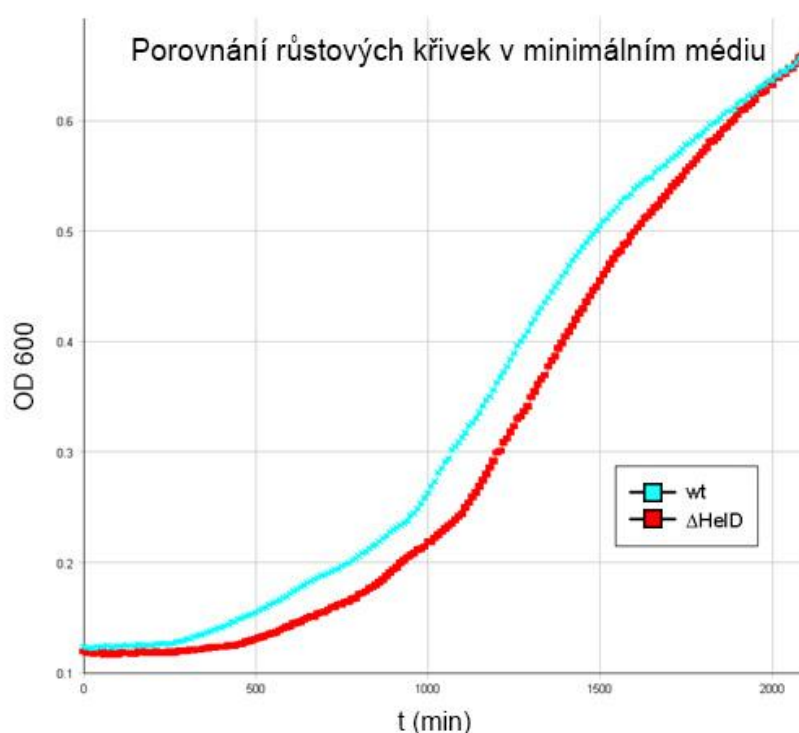
Divoký kmen je značen černými kolečky, Δ HelD kolečky bílými. V grafu jsou zobrazeny reprezentativní výsledky (experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních se stejnými výsledky).

Závěr: Obě růstové křivky, kmene divokého i Δ HelD, mají stejnou směrnici, která ilustruje stejnou rychlost dělení, a dosahují stejných hodnot optické hustoty, takže v definovaném MOPS 20 AK médiu není vidět signifikantní rozdíl mezi jednotlivými kmeny.

- **Minimální médium (MOPS 2 AK)**

Bakteriální kmeny LK809 (wt) a LK782 (Δ HelD) byly natřeny z glycerinových konzerv na agarové misky LB a kultivovány v termostatu v 37 °C po dobu přibližně 12 hodin. Další den byly přetřeny na misky s minimálním médiem, MOPS pouze se dvěma AK (Trp a Phe), a opět kultivovány v termostatu v 37 °C po dobu přibližně 12 hodin. Třetí den byly kultury zaočkovány do nového tekutého MOPS 2 AK média na OD 0,03 a pěstovány za stálého třepání v 37 °C.

V minimálním médiu mají bakteriální kmeny prodlouženou dobu zdvojení, proto byl tento experiment prováděn v spektrofotometru na mikrotitrační destičky sunrise Absorbance Reader – TECAN. Výsledky byly vyneseny do obrázku 17.



Obrázek 17: Porovnání růstových křivek divokého kmene a kmene s delecí v HelD v minimálním médiu MOPS 2 AK na mikrotitrační destičce.

Růstová křivka divokého kmene je znázorněna modrou barvou, Δ HelD barvou červenou. Data jsou přímo z TECANu (Spektrofotometr na mikrotitrační destičky sunrise Absorbance Reader – TECAN). Pozorované hodnoty OD jsou vyšší o 0,1 z důvodu měření přes fólii.

V grafu jsou zobrazeny reprezentativní výsledky (experiment byl proveden ve čtyřech nezávislých opakováních se stejnými výsledky).

Závěr: Růstové křivky obou kmenů mají stejný průběh a jednotlivé kmeny dorůstají stejných hodnot optické denzity, takže není vidět žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými kmeny.

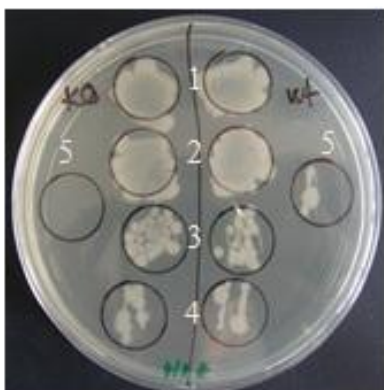
- **Vliv koncentrace soli**

Z transkripčních experimentů *in vitro* provedených v naší laboratoři bylo patrné, že přidání HelD do reakce za podmínek vysoké koncentrace KCl stimuluje transkripci *in vivo*. Proto byl za další srovnávací test zvolen růst v médiu se zvýšenou koncentrací KCl, aby bylo ověřeno, zda je přítomnost HelD důležitá pro růst bakterií ve zvýšené koncentraci soli.

Pevné médium

Kultury v exponenciální fázi kmenů LK917 (divoký BaSys Bio) a LK947 (Δ HelD BaSys Bio) byly v různých koncentracích (OD 0,3; 0,03; 0,003; 0,0003 a 0,00003) natřeny na agarózové MOPS 2 AK misky s různými koncentracemi KCl. Misky byly kultivovány v 37 °C po dobu přibližně 12 hodin. Poté byl vyhodnocován nárůst jednotlivých kmenů v jednotlivých koncentracích, viz obrázek 18.

kontrola: LB miska



MOPS 2 AK

100 mM KCl

200 mM KCl



300 mM KCl

400 mM KCl

500 mM KCl



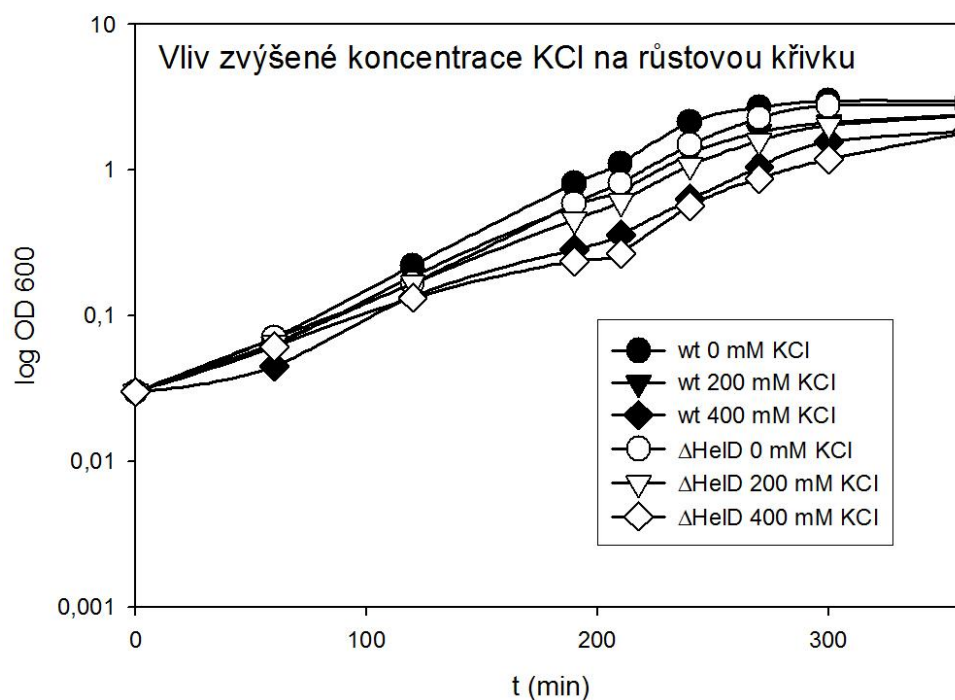
Obrázek 18: Porovnání nárůstu na miskách v závislosti na různé koncentraci soli v médiu.

Kmeny LK917 (divoký) a LK947 (Δ HelD) byly v různých koncentracích natřeny agarové MOPS 2 AK misky s různými koncentracemi KCl. OD nánosu klesají směrem dolů, na obrázku s kontrolou: 1 pro OD 0,3; 2 pro 0,03; 3 pro 0,003; 4 pro 0,0003 a 5 pro OD 0,00003. U ostatních misek jsou vzorky naneseny stejným způsobem.

Závěr: Z nárůstů na jednotlivých miskách bylo vypořováváno, že divoký kmen roste nepatrně lépe než kmen s deletovaným *helD*. Nicméně tento efekt nebyl vždy reprodukovatelný a výrazný, takže vliv KCl na růst kmene Δ HelD nebyl na pevném médiu prokázán.

Tekuté médium

Paralelně probíhal druhý experiment, a to růsty jednotlivých kmenů LK809 (divoký kmen) a LK782 (Δ HelD) v tekutém MOPS 2 AK médiu, s různou koncentrací KCl, při teplotě 37 °C za stálého třepání. Výsledky byly vyneseny do následujícího obrázku 19.



Obrázek 19: Porovnání růstových křivek divokého kmene a kmene s delecí genu pro HelD v médiu se vzrůstající koncentrací KCl.

Divoký kmen (černé značky) a kmen Δ HelD (bílé značky) byly pěstovány v definovaném MOPS 2 AK médiu s různou koncentrací KCl.

V grafu jsou zobrazeny reprezentativní výsledky (experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních se stejnými výsledky).

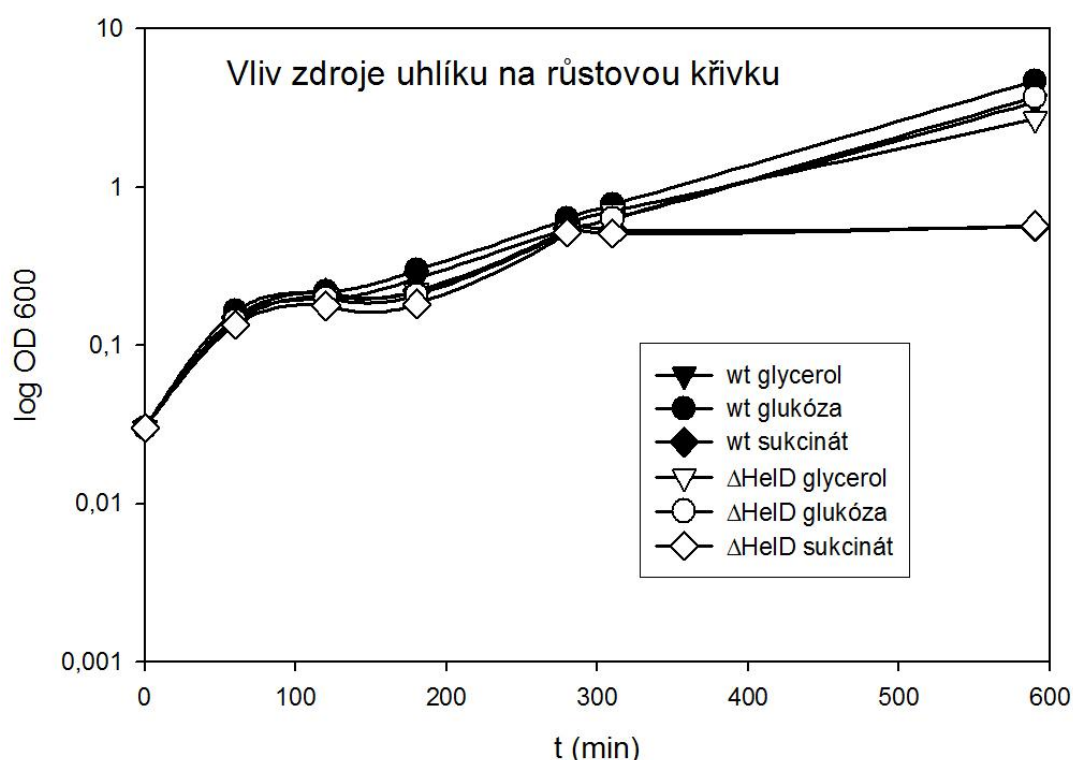
Závěr: Srovnáním růstových křivek divokého kmene a kmene s deletovaným *helD* nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl v růstu kmenů v různé koncentraci KCl. Inhibiční efekt zvyšující se koncentrace KCl se v médiu projevil u kmene divokého i kmene deletovaného stejně, kdy v médiu s žádnou přidanou solí dosahovaly růstové křivky nejvyšších hodnot OD a nejlépe prosperovaly, se zvyšující se koncentrací KCl se pak tyto hodnoty snižovaly.

Vliv KCl v tekutém médiu na růst kmene Δ HelD nebyl prokázán.

- **Růsty na různém zdroji uhlíku**

Bakteriální kmeny LK809 (divoký) a LK782 (Δ HelD) byly nechány narůst v LB médiu do pozdní stacionární fáze, zcentrifugovány a propláchnuty minimálním médiem MOPS 2 AK s různým zdrojem uhlíku – s glukózou, glycerolem nebo sukcinátem. Dále byly kmeny přetřeny na agarózové misky MOPS 2 AK s odpovídajícím zdrojem uhlíku a nechány kultivovat po dobu 12 hodin v termostatu ve 37 °C. Další den byly narostlé kultury přeočkovány do čerstvého MOPS 2 AK média s odpovídajícím zdrojem uhlíku na OD 0,03.

Výsledky byly vyneseny do následujícího obrázku 20.



Obrázek 20: Porovnání růstových křivek divokého kmenu a kmenu s delecí v HelD v médiu s různým zdrojem uhlíku.

Divoký kmen (černé značky) a kmen Δ HelD (bílé značky) byly pěstovány v definovaném MOPS 2 AK médiu s různými zdroji uhlíku.

V grafu jsou zobrazeny reprezentativní výsledky (experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních se stejnými výsledky).

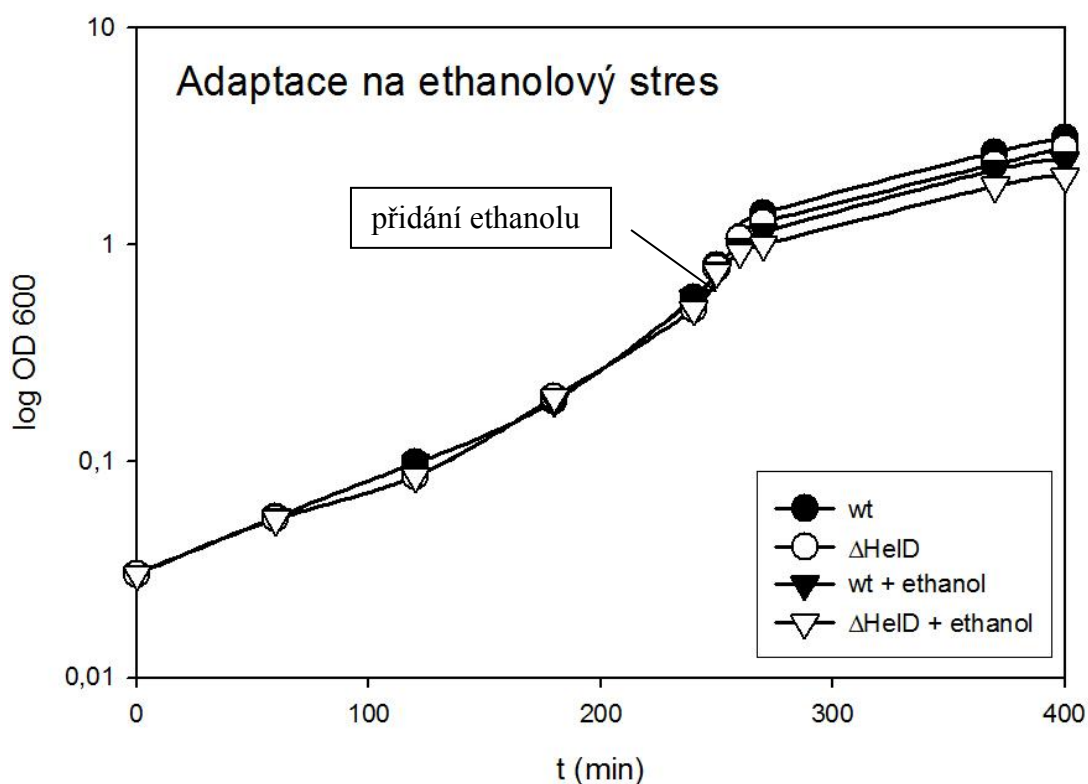
Závěr: Ze srovnání dvojic růstových křivek kmenů rostoucích na stejném zdroji uhlíku (glukóze, glycerolu nebo sukcinátu) je patrný mírný rozdíl v nejvyšších hodnotách dosažené OD v případě růstu na glukóze a glycerolu. Tento rozdíl mezi kmenem divokým a Δ HelD je však stejný jak na glukóze, tak na glycerolu, kdy

pouze na glycerolu nedosahují kmeny takových OD, protože je růst celkově zpomalen.

Významný vliv různého zdroje uhlíku na růst kmene Δ HeID tak nebyl prokázán ani na jednom médiu.

- **Adaptace na ethanolový stres**

Kmeny LK809 (divoký) a LK782 (Δ HeID) byly pěstovány v LB médiu, dokud kultura nedosáhla exponenciální fáze růstu. Poté byl do kultury přidán ethanol tak, aby jeho koncentrace byla ve finálním objemu 4%. Do kontrolních vzorků byl přidán stejný objem vody a byla pozorována adaptace na ethanolový stres viz obrázek 21.



Obrázek 21: Adaptace divokého kmene a kmene s delecí v HeID na ethanolový stres.

Divoký kmen (černé značky) a kmen Δ HeID (bílé značky) byly pěstovány v definovaném MOPS 2 AK médiu s různými zdroji uhlíku.

V grafu jsou zobrazeny reprezentativní výsledky (experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních se stejnými výsledky).

Závěr: Po přidání ethanolu do bakteriální kultury divokého kmene byl růst zpomalen, stejně tak v případě kmene Δ HeID. Rozdíly mezi stresovaným divokým

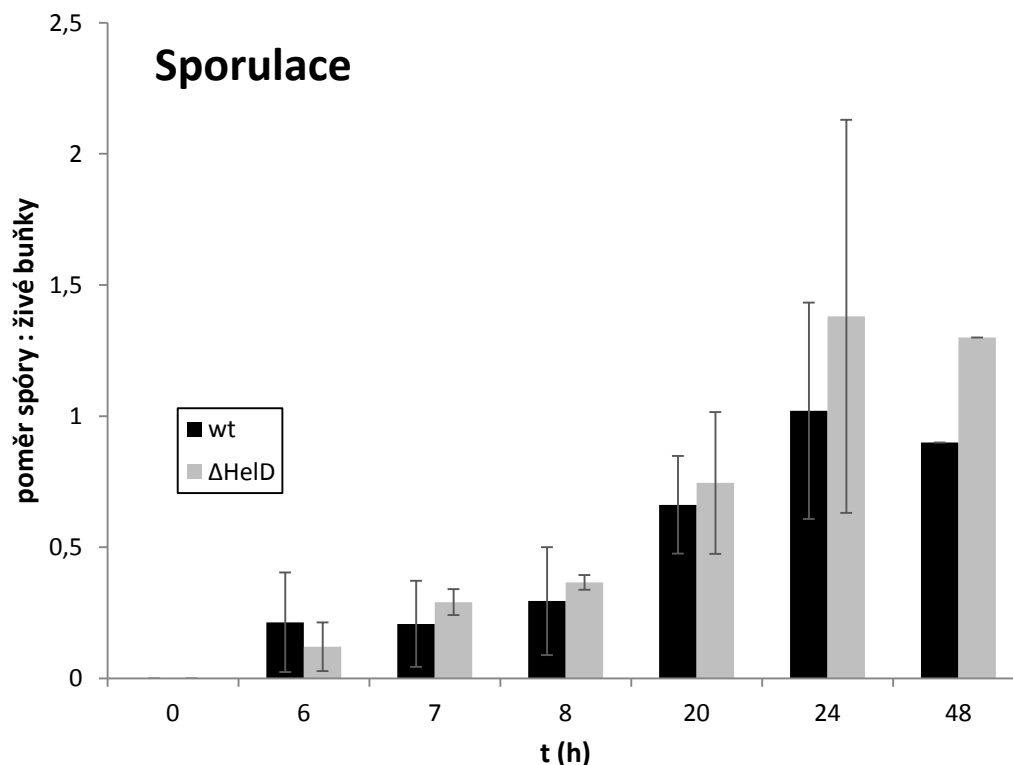
kmenem a kontrolním vzorkem jsou pak stejné i u kmene Δ HeID, takže nebyl pozorován rozdíl v rychlosti a míře adaptace na ethanolový stres.

- **Sporulace**

Z obrázku 9 je patrné, že hladina exprese HeID se při vstupu do stacionární fáze a sporulace zvyšuje. Byl tak sledován i fenotypový projev kmenu LK917 (divoký) a LK947 (Δ HeID) při vstupu růstové křivky do stacionární fáze a nově vzniklé spory.

Bakteriální kultury byly zaočkovány z glycerinových konzerv do CH média s příslušným antibiotikem a nechány kultivovat v 37 °C za stálého třepání po dobu přibližně 12 hodin. Poté byly naředěny do čerstvého CH média na OD 0,03. V přechodné stádiu mezi fází exponenciální a stacionární byly kultury zcentrifugovány a resuspendovány ve stejném objemu SM média. V tomto sporulačním médiu vznikají první spory po 6 hodinách. V časových intervalech byly odebrány vzorky a poté byly vyhodnocovány počty kolonií na LB miskách, viz obrázek 22.

Přesný postup je popsán v kapitole 3.5.2.



Obrázek 22: Poměr spór ku živým buňkám divokého kmene a kmene s delecí v HeID.

Do grafu byly vyneseny poměry počtu spór ku živým buňkám divokého kmene (černě) a kmene Δ HeID (šedivě). Graf ukazuje data ze tří nezávislých opakování.

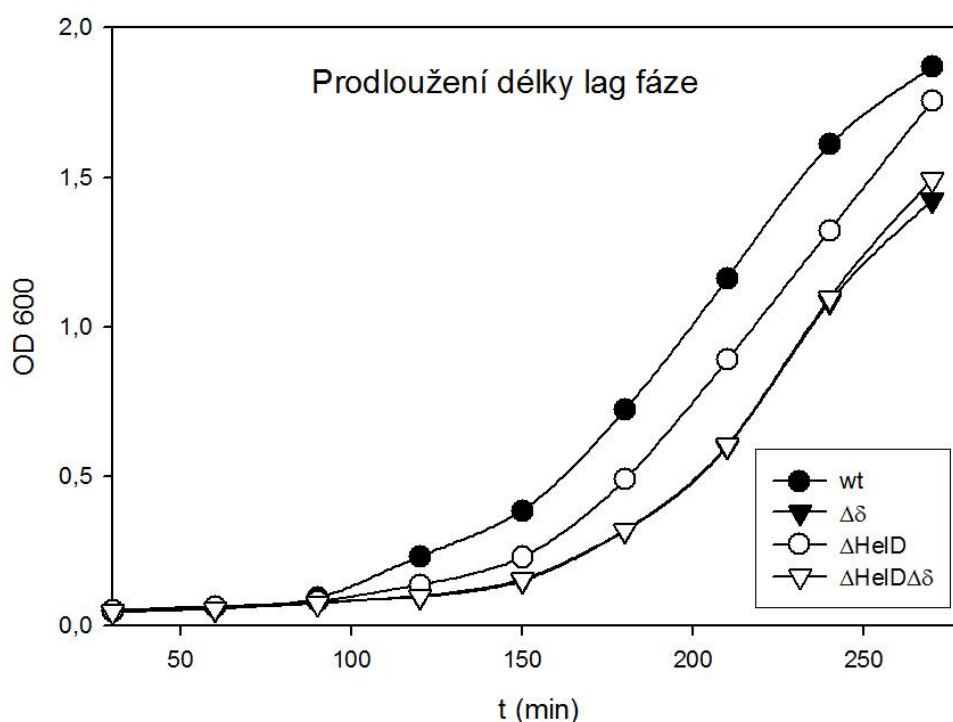
Závěr: Je patrné, že první spory vznikají až po 6 hodinách a jejich počet se se vzrůstajícím časem zvyšuje. Je zajímavé, že ΔHelD má mírně vyšší poměr spór ku živým buňkám, ovšem pro vysoké hodnoty chybových úseček nelze tento jev označit za dostatečně významný.

- **Délka lag fáze**

V naší laboratoři byl z transkripčních experimentů *in vitro* vypočítáván vztah mezi HelD a podjednotkou δ . Vztah těchto dvou genů jsme chtěli otestovat *in vivo*. Z již dříve provedených fenotypových experimentů bylo známo, že kmen s delecí podjednotky δ vykazuje prodlouženou lag fázi při přesazení z pozdní stacionární fáze do čerstvého média.

Bakteriální kmeny LK809 (divoký), LK782 (ΔHelD), LK637 ($\Delta\delta$) a LK1032 ($\Delta\text{HelD}\Delta\delta$) byly pěstovány v LB médiu po dobu 24 hodin ve 37 °C za stálého třepání. Po vstupu do pozdní stacionární fáze byly kmeny naředěny do čerstvého LB média na konečnou OD 0,03.

Výsledky byly vyneseny do následujícího obrázku 23.



Obrázek 23: Prodloužení délky lag fáze.

Divoký kmen, kmen s delecí v proteinu HelD, kmen s delecí v podjednotce δ RNAP a kmen s delecí HelD i v podjednotce δ po vstupu do pozdní stacionární fáze byly kmeny naředěny do čerstvého LB média.

V grafu jsou zobrazeny reprezentativní výsledky (experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních se stejnými výsledky).

Závěr: Kmen Δ HelD má lag fázi prodlouženou přibližně o 15 minut oproti divokému kmenu, kmen s delecí v podjednotce δ má lag fázi prodlouženou přibližně o 30 minut, stejně jako kmen s dvojitou delecí. Pozorovaný rozdíl je výrazný a reprodučibilní.

5.4 Biochemické experimenty *in vitro*

Cílem tohoto bloku experimentů bylo potvrdit interakci HelD s RNAP, otestovat schopnost HelD vázat a rozplétat DNA a určit, jaký má HelD vliv na transkripci *in vitro*.

K interakčním experimentům s RNAP bylo nutné protein HelD radioaktivně naznačit pomocí $[\gamma - ^{32}\text{P}] - \text{ATP}$. Toto značení provádí enzym Protein kináza A, která má afinitu k sedmi AK připojených na konec proteinu (PKA doména, tzv. Kemptide). Tato doména byla zaklonována do plazmidu pET22b již dříve v naší laboratoři pomocí restrikčních míst *NdeI* a *BamHI*. Takto modifikovaný plazmid byl označen jako pET22b-PKA (LK403).

Pro interakční studie bylo tedy nutné vytvořit vyrobit modifikovanou variantu HelD s kinázovací doménou.

5.4.1 Příprava modifikovaného proteinu HelD s kinázovací doménou

Amplifikace genu *helD* proběhla standardně podle metod klonování DNA, popsanych v kapitole 3.6.5, s využitím Expand High Fidelity PCR systému (Roche). Pro amplifikaci byly navrženy následující primery:

primer s označením 479 5' cg **ggatcc** atg aat cag cag gat aag g 3'
(primer pro 5' konec genu, *forward*, obsahující restrikční místo pro *BamHI*, červeně)

primer s označením 480 5' ccg **ctcgag** ttc agc aat ctg ata taa gtg 3'
(primer pro 5' konec genu, *reverse*, obsahující restrikční místo pro *XhoI*, modře)

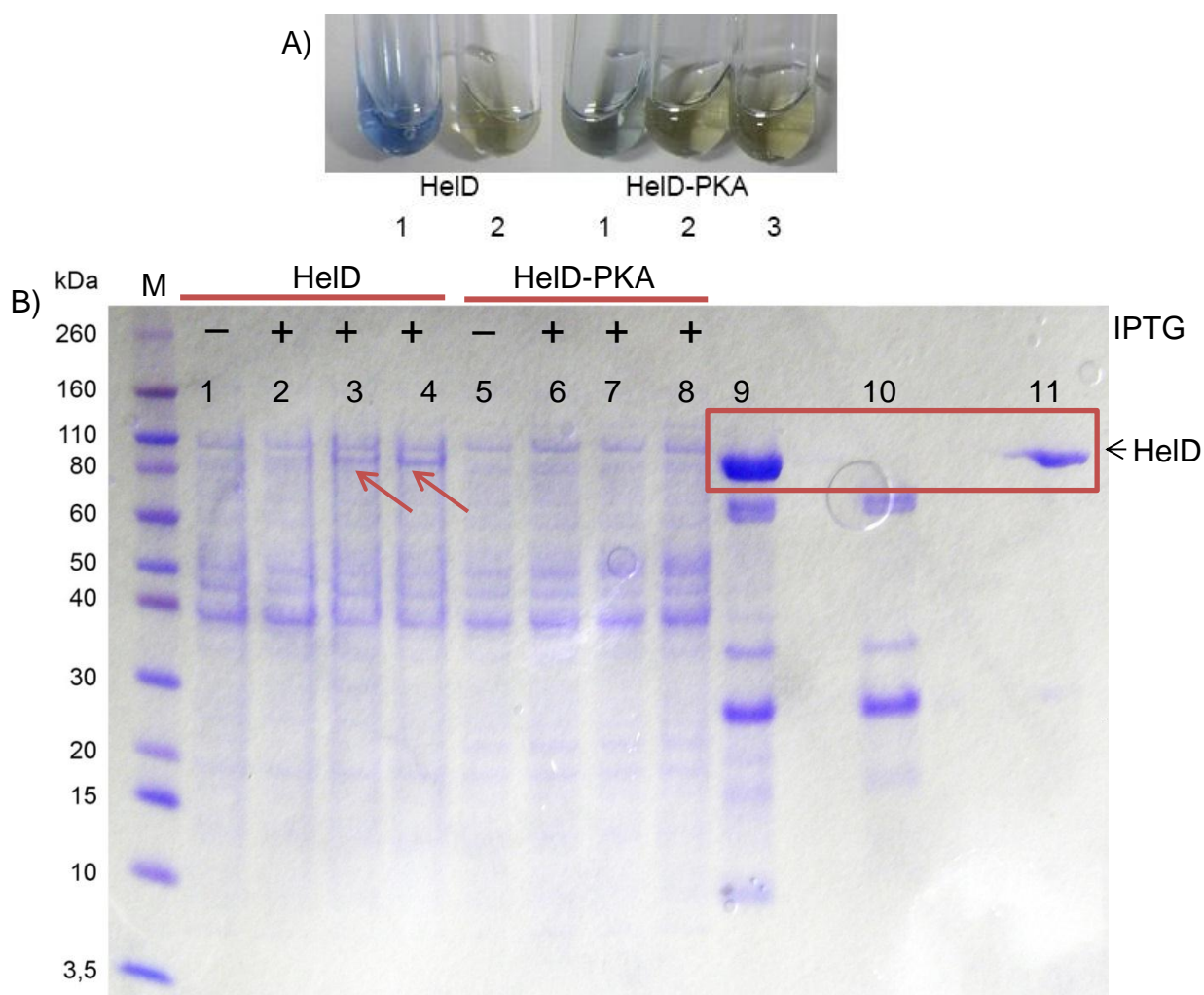
Gen pro *helD* byl zaklonován do plazmidu pET22b-PKA, byl tedy vložen pod T7 indukibilní promotor a na C-konci byla připojena histidinová kotva pro následnou izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie a také kinázovací doména pro následné radioaktivní naznačení promotoru.

Získaný vektor byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α . Minipreparací a následnou restrikční analýzou bylo otestováno správné vložení konstruktů do plazmidu. Sekvence genu *helD* byla ověřena sekvenací.

Expresa a purifikace

Připravený plazmid pET22b-PKA nesoucí gen *helD* byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3) a byly vytvořeny glycerinové konzervy pro dlouhodobé uchování kmenů – LK918 a LK919.

Z glycerinových konzerv byl zaočkován 1 litr LB média s ampicilinem a kultura byla ponechána růst do OD 0,75. Poté byla přidáním IPTG spuštěna indukce a kultura byla indukována další 3 hodiny v pokojové teplotě. Izolace proteinu byla následně provedena podle metody popsané v kapitole 3.7.1, pomocí afinitní chromatografie. Množství proteinu v eluovaných frakcích bylo vizualizováno pomocí Bradfordové činidla a elektroforeticky na SDS-PAGE. Frakce obsahující požadovaný protein byly následně přečištěny dialýzou v glycerolovém pufru, viz kapitola 3.7.2, výsledky jsou zobrazeny v obrázku 24.



Obrázek 24: Expresa a purifikace HelD s kinázovací doménou.

Porovnání míry úspěšnosti u izolace HelD z kmene LK800 a HelD-PKA z kmene LK918.

A) Vizualizace koncentrace proteinů podle Bradfordové

B) Purifikace HelD

Na A) je u HelD vidět jasně modré zabarvení u frakce 1, značící vysokou koncentraci proteinů ve vzorku. U HelD-PKA je vzorek jen lehce namodralý. Toto se potvrdilo i po elektroforetické vizualizaci proteinů pomocí SDS-PAGE (B). V oblasti ve velikosti ~ 90 kDa, kde se má nacházet proužek, značící HelD, je ve sloupci 9 (HelD z LK800) silný pruh, ve sloupci 10 (HelD-PKA z LK918) není patrné nic. Ve sloupci 11 je již přečištěný protein HelD, který tu slouží jako kontrola a je používán v laboratoři k dalším experimentům. První čtyři sloupce jsou vzorky odebírané při indukci kmene LK800 v časech před indukcí, 0,30 min, 1 h a 2 h a je vidět nepatrné zvětšení proužku v oblasti helikázy (červené šipky). Další 4 sloupce (5-8) jsou vzorky odebírané při indukci kmene LK918 a žádný nárůst indukce pozorován není. Indukce byla sušena přidáním IPTG do média.

Jako marker (M) byl použit Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard

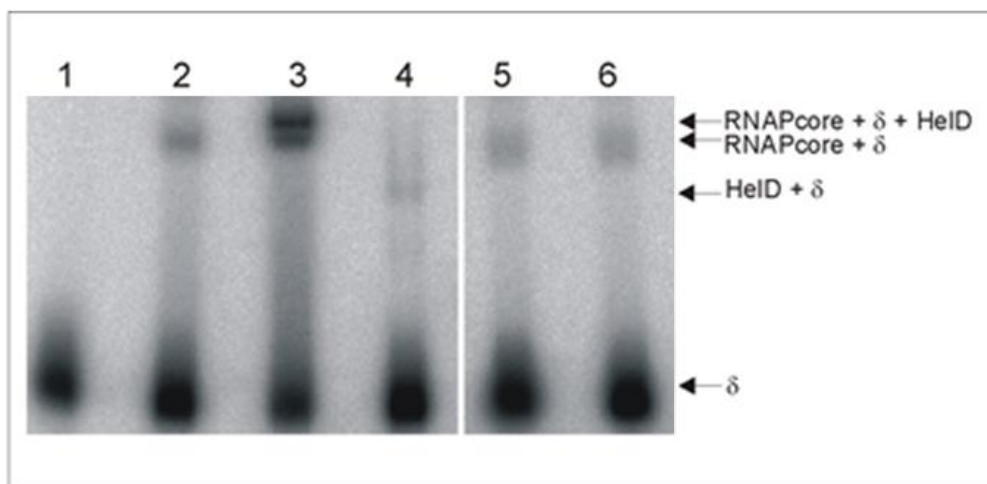
Závěr: Modifikovanou variantu proteinu HelD se nepodařilo vyizolovat navzdory velkému úsilí vloženému do této části projektu, viz obrázek 24. Izolace byla prováděna paralelně pro kmen LK800, který exprimuje nemodifikovanou HelD, a pro kmen LK918, který v sobě nese HelD s kinázovací doménou (HelD-PKA). Z obrázku je patrné, že exprese a izolace nemodifikovaného HelD proběhla úspěšně, i když ne s vysokým výtěžkem, zatímco HelD-PKA se tvoří pouze ve stopovém množství. Důvodem by mohla být nestabilní forma proteinu s kinázovací doménou, která je v buňce rychle degradována.

Radioaktivní naznačení HelD-PKA

I přes neúspěšnou vizualizaci HelD-PKA bylo rozhodnuto zkusit naznačit případné nepatrné množství proteinu ve frakci 1 pomocí radioaktivního [γ - ^{32}P] – ATP. Postup značení se nachází v kapitole 3.7.5. Ovšem ani citlivější detekce proteinů pomocí radioaktivity nebyla úspěšná.

Interakční studie mezi HelD a RNAP

Přímá interakce HelD a RNAP tak nemohla být provedena, ale interakce byla dokázána nepřímo (obrázek 25) pomocí radioaktivně naznačené podjednotky δ , experimenty nazývané gel shifty na nativní polyakrylamidové elektroforéze provedené kolegyní Janou Korelusovou v naší laboratoři.



Obrázek 25: Vazba HelD na RNAP.

1 – δ ; **2** – δ + RNAP $\Delta\delta$; **3** – δ + RNAP $\Delta\delta$ + HelD; **4** – δ + HelD; **5** – δ + RNAP $\Delta\delta\Delta$ HelD + denaturovaná HelD; **6** – δ + RNAP $\Delta\delta$ + BSA

Podjednotka δ je radioaktivně naznačena, obrázek je z nativní polyakrylamidové elektroforézy. (Korelusová et al., rukopis v přípravě)

Závěr: Byl připraven konstrukt HelD s kinázovací doménou, tento konstrukt byl sekvenačně ověřen, avšak při purifikaci nebyl modifikovaný protein HelD-PKA získán v dostatečném množství. Je možné, že kinázovací doména zvyšuje biologickou nestabilitu proteinu.

Potvrzení vazby HelD na RNAP byl tak bylo provedeno pomocí radioaktivně značené podjednotky δ , kdy na obrázku 25 je v sloupci 1 je patrná pozice podjednotky δ , ve sloupci 2 se objevuje proužek ve vyšších polohách, značící navázání podjednotky δ na RNAP a ve sloupci 3 je patrný posun ještě do vyšších poloh, značící, že se ke komplexu RNAP a podjednotky δ navázal ještě protein HelD. Tak byla potvrzena vazba HelD na RNAP.

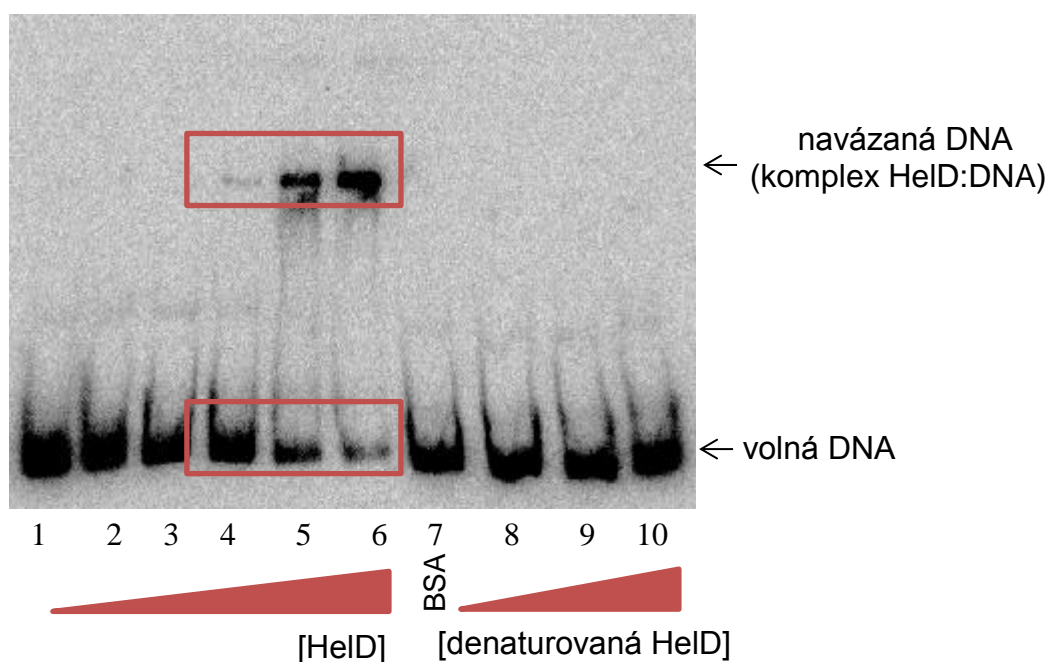
5.4.2 Může HelD vázat a rozplétat DNA?

Protože HelD teoreticky přísluší do rodiny DNA helikáz s 3'–5' rozplétací aktivitou, byly navrženy experimenty ověřující základní charakteristiku helikáz – vazbu DNA a rozplétání DNA.

5.4.2.1 Vazba DNA

Vizualizace vazby DNA byla prováděna pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. Do reakcí bylo přidáno stálé množství radioaktivně značené DNA a množství HelD se postupně zvyšovalo. Jako kontrola specifity byl použit denaturovaný protein HelD, který tak ztratil svou funkci a protein BSA, který DNA neváže. Volná DNA doputuje v gelu dále než komplex DNA:HelD a vytvoří na gelu proužek v jiných oblastech.

Vyhodnocení primárních dat probíhalo pomocí programu Bio-Rad Molecular Imager FX, viz obrázek 26.



Obrázek 26: Vazba DNA na HelD.

Nativní polyakrylamidová elektroforéza s radioaktivně značenou DNA.

1 dsDNA

2 dsDNA + RNAP Δ HelD:HelD v poměru 1:1

3 dsDNA + RNAP Δ HelD:HelD v poměru 1:2

4 dsDNA + RNAP Δ HelD:HelD v poměru 1:20

5 dsDNA + RNAP Δ HelD:HelD v poměru 1:200

6 dsDNA + RNAP Δ HelD:HelD v poměru 1:320

7 dsDNA + RNAP Δ HelD:BSA v poměru 1:320

8 dsDNA + RNAP Δ HelD:denaturovaná HelD v poměru 1:2

9 dsDNA + RNAP Δ HelD:denaturovaná HelD v poměru 1:20

10 dsDNA + RNAP Δ HelD:denaturovaná HelD v poměru 1:320

Závěr: HelD váže DNA. Z primárních dat (viz obr. 26) je patrné, že se zvyšující se množstvím HelD postupně slábnul signál nenavázané, volné DNA. Zároveň se zvyšoval radioaktivní signál navázané DNA na HelD. Pro lepší ověření, zda se jedná o specifický efekt proteinu HelD, byl experiment proveden i s proteinem BSA nebo s denaturovaným HelD. V obou případech nebyla detekována vazba DNA na protein.

5.4.2.2 Helikázové experimenty

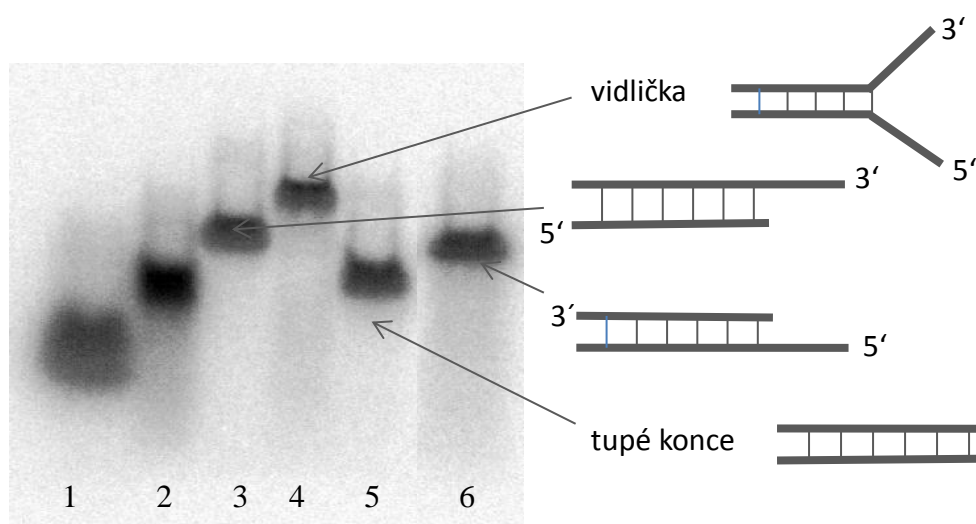
Testy helikázové aktivity byly prováděny pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. Templáty pro rozplétání byly navrhnuty podle (Cao a Julin, 2009), viz tabulka 3. K těmto templátům (viz obr. 27), kdy bylo vždy jen jedno vlákno radioaktivně naznačeno, byla

přidávána zvyšující se koncentrace HelD.. Reakce probíhala po dobu 15 minut ve 37 °C, více viz kapitola 3.8.2.

Vyhodnocení primárních dat probíhalo pomocí programu Bio-Rad Molecular Imager FX, viz obrázek 28.

Tabulka 3: Oligonukleotidy na templáty na rozplétací experimenty podle (Cao a Julin, 2009).

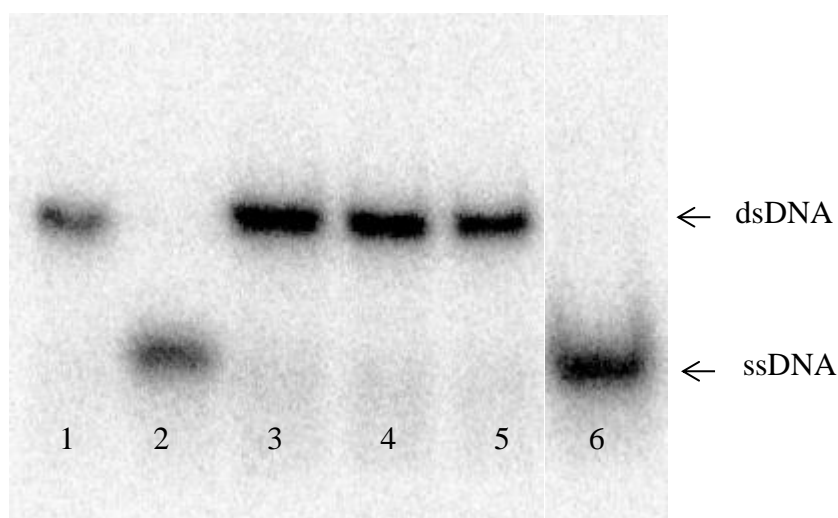
Jméno	Délka (nt)	Sekvence (5'-3')	Sktruktura templátu
Oligo-1	32	GCCGTAGTATGCACATCGACATCCATCGACAT	1 + 2: 20 bp, 12 nt 3'-přesah
Oligo-2	20	GTCGATGTGCATACTACGGC	2 + 3: 20 bp, tupé konce
Oligo-3	20	GCCGTAGTATGCACATCGAC	3 + 4: 20 bp, 12 nt 5'-přesah
Oligo-4	32	TACAGCTACCTAGTCGATGTGCATACTACGGC	1 + 4: 20 bp, vidlička



Obrázek 27: Druhy templátů na rozplétací experimenty.

Nativní polyakrylamidová elektroforéza s radioaktivně značenou DNA.

- 1 radioaktivně naznačené oligo-2
- 2 radioaktivně naznačené oligo-4
- 3 templát s 3' přesahem
- 4 templát vidlička
- 5 templát s tupými konci
- 6 templát s 5' přesahem



Obrázek 28: Rozplétací aktivita HelD.

Nativní polyakrylamidová elektroforéza s radioaktivně značenou dsDNA.

1 dsDNA

2 denaturovaná dsDNA

3 dsDNA + denaturovaná 150 mM HelD

4 dsDNA + 50 mM HelD

5 dsDNA + 150 mM HelD

6 ssDNA, radioaktivně značená

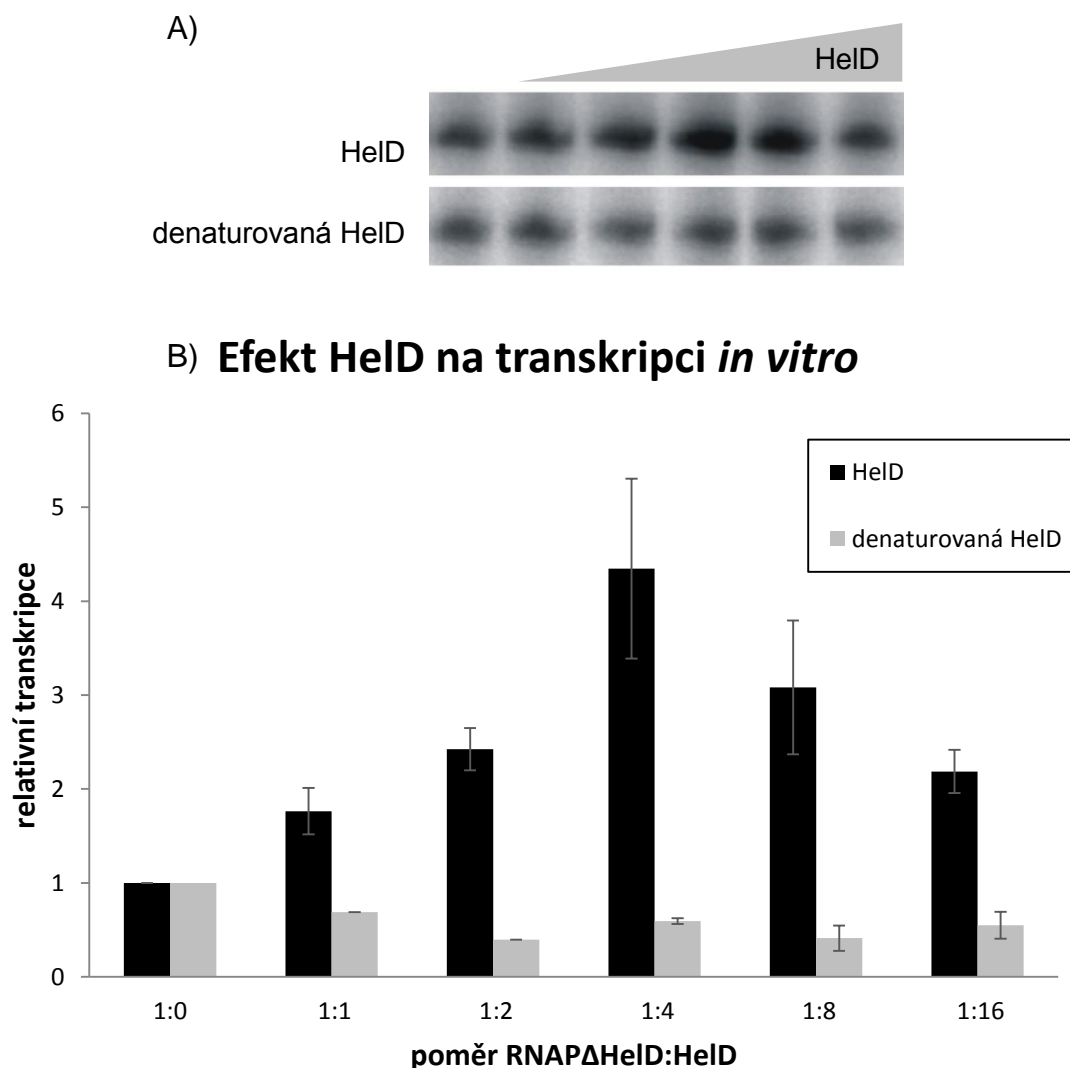
Závěr: Helikázovou aktivitu se u HelD nepodařilo detekovat. Pokud by rozplétací experimenty proběhly úspěšně, byl by na gelu na obrázku 27 vidět posun z oblasti dvouvláknové DNA do oblasti DNA jednovláknové, což by značilo rozpletení duplexu DNA proteinem HelD. Avšak ani po mnoha optimalizacích nebyl tento efekt pozorován, HelD tedy pravděpodobně helikázovou, rozplétací aktivitu nemá.

5.4.3 Efekt HelD na transkripci *in vitro*

V následujícím experimentu byl studován efekt proteinu HelD na transkripci *in vitro* na promotoru *Pveg*. Ve všech reakcích byla použita konstantní molární koncentrace RNAP Δ HelD a zvyšující se koncentrace nativního nebo denaturovaného proteinu HelD.

RNAP byla nejprve rekonstituovaná s faktorem σ^A v molárním poměru 1:10. Poté byla provedena transkripce se zvyšujícím se množstvím nativního a denaturovaného proteinu HelD po dobu pět minut v 90 °C. Přesný popis experimentu se nachází v kapitole 3.9.1. Transkripce probíhala 15 minut ve 30 °C.

Vyhodnocení primárních dat probíhalo pomocí programu Bio-Rad Molecular Imager FX, kterým byly měřeny intenzity jednotlivých signálů a následně byly kvantifikovány pomocí programu Bio-Rad Quantity One. Výsledky byly zpracovány a vyneseny do grafu pro větší přehlednost, viz obrázek 29B.



Graf 29: Efekt HeID na transkripci *in vitro* na promotoru *Pveg*.

A) Primární data z transkripce *in vitro*. Směrem doprava narůstá množství proteinu HeID přidaného do reakce a je patrný zvyšující se signál v horním řádku (nativní HeID). Reakce ve spodním řádku probíhala ve stejném množství proteinu HeID, ale v jeho denaturované variantě.

B) Vyhodnocení provedené do grafu. Graf ukazuje data ze tří nezávislých opakování. Data byla normalizována k poměru 1:0. Černé sloupce znázorňují zvyšující se množství HeID a šedé sloupce zvyšující se množství denaturované HeID. Je patrná stimulace transkripce v případě HeID.

Závěr: HeID stimuluje transkripci *in vitro*. Z primárních dat (obr. 29A) i z kvantitativního vyhodnocení pomocí grafu (obr. 29B) je patrné, že se zvyšující se molární koncentrací HeID stoupá míra relativní transkripce. Od určitého množství HeID dochází k poklesu stimulace, pravděpodobně v důsledku nespecifické interakce HeID s DNA.

6 Diskuze

6.1 Hledání homologů HelD v jiných bakteriálních kmenech

Hledání homologů proteinu HelD ukázalo, že se HelD vyskytuje u kmene *Firmicutes* G+ bakterií, stejně tak jako další intenzivně studovaný protein v naší laboratoři, podjednotka δ RNAP (Rabatinova et al., 2013). U ostatních bakteriálních kmenů se podařilo nalézt pouze částečné fragmenty homologní s vysoce konzervovanými helikázovými motivy.

Vytvořené srovnání homologních helikáz z různých bakteriálních druhů se vyznačuje velkou sekvenční identitou v konzervovaných oblastech helikázových motivů, v ostatních oblastech se jinak často liší.

6.2 Charakteristika HelD fenotypovými testy *in vivo*

Srovnávací růstové experimenty sloužily k nalezení podmínek, ve kterých by se projevil fenotyp absence proteinu HelD. Tyto podmínky by pak mohly poukazovat na roli proteinu HelD v buňce.

Po experimentech provedených v bohatém médiu, v médiu minimálním a v médiu s různým zdrojem uhlíku, nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi kmenem divokým a kmenem Δ HelD. Rozdíl nebyl pozorován ani v míře adaptace na ethanolový stres či stres způsobenou vyšší koncentrací soli v médiu.

Expres HelD se zvyšuje v přechodu do stacionární fáze (Nicolas et al., 2012), byl proto sledován vliv HelD na sporulaci. Byl pozorován mírný náznak toho, že by kmen Δ HelD mohl mít vyšší poměr spór ku živým buňkám, což by znamenalo rychlejší vstup do sporulace. Stejný fenomén byl pozorován v případě kanibalismu u *B. subtilis* (Gonzalez-Pastor et al., 2003), kdy kmen s delecí operonů *skf* nebo *sdp* (operony potřebné pro kanibalismus) má urychlený vstup do sporulace a rychlejší formování spór oproti divokému kmenu. Je tak v normálním prostředí limitován kratší rozhodovací fází mezi normálním stavem buňky a sporulací, a pokud sporulovat začne a podmínky se náhle zlepší, už se nemůže vrátit do normálního stavu, ale musí sporulaci dokončit.

Jediným výrazným fenotypem delece *helD* byla prodloužená lag fáze stacionárních buněk naředěných do čerstvého média – neschopnost rychle zareagovat na nutriční změny v prostředí. Tento fenotyp byl podobný fenotypu kmene s deletovanou podjednotkou δ ,

kódovanou genem *rpoE*, dalším proteinem intenzivně studovaným v naší laboratoři (Motackova et al., 2010; Rabatinova et al., 2013). Mutanty s delecí *rpoE* se neliší v životaschopnosti ani v rychlosti růstu oproti divokému kmenu za standardních podmínek, byla však u nich pozorována prodloužená lag fáze přibližně o 30 minut oproti kmenu divokému (Lopez de Saro et al., 1999).

Prodloužení lag fáze tak byla již druhá indicie, která spojovala proteiny HelD s δ . Tou první byl výskyt obou proteinů ve stejném kmeni bakterií, u *Firmicutes*. Paralelně pak ještě probíhaly transkripční experimenty *in vitro*, které ukázaly, že HelD a δ spolu spolupracují - stimulují disociaci terminačního komplexu a napomáhají tak recyklaci RNAP a tím zvyšují míru transkripce (Korelusová et al., rukopis v přípravě).

Z těchto důvodů byly v experimentu s prodloužením lag fáze srovnávány čtyři kmeny: divoký kmen, kmen Δ HelD, kmen $\Delta\delta$ a kmen Δ HelD $\Delta\delta$. Kmen Δ HelD měl lag fázi prodlouženou o 15 minut, stejně jako v předchozích experimentech. U kmene $\Delta\delta$ se rovněž potvrdilo prodloužení o cca 30 minut a stejnou dobu prodloužení vykazoval i kmen s dvojitou delecí, kmen Δ HelD $\Delta\delta$. Stejný fenotyp tak naznačuje úzký vztah proteinů HelD a δ a bude v naší laboratoři dále studován. Hypotéza je, že δ je efektozem, jehož funkce je zlepšována pomocí HelD.

6.3 Biochemické experimenty *in vitro*

- **Vazba HelD na RNAP**

HelD je protein, který interaguje s RNAP a váže se na ni. Vazba na RNAP se pomocí modifikovaného proteinu HelD s kinázovací doménou nepodařila prokázat, protože se HelD-PKA nepodařilo připravit v dostatečném množství a kvalitě. Proto byla vazba na RNAP dokázána nepřímou, přes radioaktivně značenou podjednotku δ (Korelusová et al., rukopis v přípravě).

- **Vazba HelD na DNA a helikázová aktivita**

Z bioinformatického modelování je známo, že HelD obsahuje DNA vazebnou doménu. Vazba DNA na HelD byla prokázána pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy a radioaktivně značené DNA.

Helikázová aktivita u HelD nebyla prokázána. HelD, jako DNA helikáza, má předpokládanou 3'–5' helikázovou aktivitu, ovšem ta na templátech podle (Cao a Julin, 2009) nebyla pozorována.

- **Efekt HelD na transkripci**

Protein HelD vykázal stimulující efekt na transkripci *in vitro*, kdy největší míra stimulace byla dosažena v poměru RNAP:HelD 1:4. HelD pravděpodobně usnadňuje recyklaci RNAP.

6.4 Srovnání HelD a RapA

Dostupné informace z literatury a bioinformatická srovnání neodhalila přímý homolog HelD mimo kmen *Firmicutes*. Nicméně, protein RapA z *E. coli* by mohl být analogem HelD (obecné charakteristiky RapA jsou popsány v kapitole 2.3.4.). Tyto dva proteiny nemají sekvenční podobnost a jsou z různých helikázových rodin.

HelD i RapA ale obsahují stejné helikázové motivy a ATP vazebnou doménu. U proteinu HelD nebyla pozorována helikázová aktivita a to samé platí i pro RapA (Sukhodolets a Jin, 1998). U proteinu RapA byl navržen možný efekt na rozplétání komplexu dsDNA-RNA (McKinley a Sukhodolets, 2007); bylo by tak zajímavé určit, zda by HelD nemohl mít stejný efekt.

HelD pomáhá buňce vyrovnat se s mutacemi způsobenými UV zářením (Carrasco et al., 2001), zatímco RapA nemá žádný efekt na množství spontánních mutací či mutací indukovaných UV zářením (Sukhodolets a Jin, 2000).

V bakteriální buňce mohou mít HelD a RapA stejnou/podobnou funkci – i pro RapA bylo ukázáno, že stimuluje recyklaci RNAP (Sukhodolets et al., 2001; Jin et al., 2011; Korelusová et al., rukopis v přípravě). HelD má stimulující efekt na transkripci *in vitro*, stejně tak RapA, který napomáhá transkripci za vysoké koncentrace soli, kdy je DNA pevně sbalena v nadšroubovicové formě (Sukhodolets a Jin, 2000).

Molekulární mechanismus účinku HelD a RapA na transkripci se však bude pravděpodobně lišit, protože HelD potřebuje pro maximální účinek přítomnost podjednotky δ .

Shrnuto, protein HelD, studovaný a charakterizovaný v této práci je platným členem transkripčního aparátu a další výzkum bude třeba pro detailní pochopení mechanismu jeho fungování.

7 Závěr

Byl studován a charakterizován protein HelD z *B. subtilis*:

- **HelD** – nově identifikovaná součást transkripčního aparátu.
- **HelD** se nachází u kmene *Firmicutes*, skupiny G⁺ bakterií.
- **HelD** interaguje s RNAP.
- **HelD** váže DNA.
- **HelD** nevykazuje helikázovou aktivitu (podobně jako RapA z *E. coli*).
- **HelD** stimuluje transkripci *in vitro*.
- **HelD** s podjednotkou δ spolu v bakteriální buňce pravděpodobně spolupracují.

Celkově tato diplomová práce přispěla k pochopení mechanismu regulace transkripce u *B. subtilis* pomocí nově identifikovaného transkripčního faktoru HelD.

8 Seznam použité literatury

- Abdel-Monem,M. and Hoffmann-Berling,H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* 65, 431-440.
- Achberger,E.C. and Whiteley,H.R. (1980). The interaction of Escherichia coli core RNA polymerase with specificity-determining subunits derived from unmodified and SP82-modified Bacillus subtilis RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 255, 11957-11964.
- Ahnert,P. and Patel,S.S. (1997). Asymmetric interactions of hexameric bacteriophage T7 DNA helicase with the 5'- and 3'-tails of the forked DNA substrate. *J. Biol. Chem.* 272, 32267-32273.
- Artsimovitch,I., Svetlov,V., Anthony,L., Burgess,R.R., and Landick,R. (2000). RNA polymerases from Bacillus subtilis and Escherichia coli differ in recognition of regulatory signals in vitro. *J. Bacteriol.* 182, 6027-6035.
- Browning,D.F. and Busby,S.J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 57-65.
- Burgess,R.R. (1969). Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 244, 6168-6176.
- Burgess,R.R., Travers,A.A., Dunn,J.J., and Bautz,E.K.F. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221, 43-46.
- Cao,Z. and Julin,D.A. (2009). Characterization in vitro and in vivo of the DNA helicase encoded by Deinococcus radiodurans locus DR1572. *DNA Repair (Amst)* 8, 612-619.
- Carrasco,B., Fernandez,S., Petit,M.A., and Alonso,J.C. (2001). Genetic recombination in Bacillus subtilis 168: effect of DeltahelD on DNA repair and homologous recombination. *J. Bacteriol.* 183, 5772-5777.
- Caruthers,J.M. and McKay,D.B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 123-133.
- Chen,J., Darst,S.A., and Thirumalai,D. (2010). Promoter melting triggered by bacterial RNA polymerase occurs in three steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 12523-12528.
- Dehaseth,P.L., Zupancic,M.L., and Record,M.T., Jr. (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 180, 3019-3025.
- Delumeau,O., Lecoite,F., Muntel,J., Guillot,A., Guedon,E., Monnet,V., Hecker,M., Becher,D., Polard,P., and Noirot,P. (2011). The dynamic protein partnership of RNA polymerase in Bacillus subtilis. *Proteomics.* 11, 2992-3001.
- Dillingham,M.S. (2011). Superfamily I helicases as modular components of DNA-processing machines. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 413-423.

- Dillingham, M.S., Soultanas, P., Wiley, P., Webb, M.R., and Wigley, D.B. (2001). Defining the roles of individual residues in the single-stranded DNA binding site of PcrA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8381-8387.
- Gonzalez-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., and Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301, 510-513.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235, 16-24.
- Gruber, T.M. and Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441-466.
- Hall, M.C. and Matson, S.W. (1999). Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* 34, 867-877.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Haugen, S.P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 507-519.
- Jin, D.J., Zhou, Y.N., Shaw, G., and Ji, X. (2011). Structure and function of RapA: a bacterial Swi2/Snf2 protein required for RNA polymerase recycling in transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1809, 470-475.
- Johnston, E.B., Lewis, P.J., and Griffith, R. (2009). The interaction of *Bacillus subtilis* sigmaA with RNA polymerase. *Protein Sci.* 18, 2287-2297.
- Korelusova, J., Sudzinova, P., Koval, T., Rabatinova, A., Sanderova, H., Rittich, S., Dohnalek, J., Lewis, P., and Krasny, L. Characterization of HelD, an interaction partner of RNAP from *Bacillus subtilis*. *Rukopis v přípravě*.
- Krasny, L. and Gourse, R.L. (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.* 23, 4473-4483.
- Krasny, L., Tiserova, H., Jonak, J., Rejman, D., and Sanderova, H. (2008). The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 69, 42-54.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., and . (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Lampe, M., Binnie, C., Schmidt, R., and Losick, R. (1988). Cloned gene encoding the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Gene* 67, 13-19.

- Lopez de Saro, F.J., Yoshikawa, N., and Helmann, J.D. (1999). Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 274, 15953-15958.
- MacDougall, I.J., Lewis, P.J., and Griffith, R. (2005). Homology modelling of RNA polymerase and associated transcription factors from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Graph. Model.* 23, 297-303.
- MacLellan, S.R., Guariglia-Oropeza, V., Gaballa, A., and Helmann, J.D. (2009). A two-subunit bacterial sigma-factor activates transcription in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 21323-21328.
- McKinley, B.A. and Sukhodolets, M.V. (2007). *Escherichia coli* RNA polymerase-associated SWI/SNF protein RapA: evidence for RNA-directed binding and remodeling activity. *Nucleic Acids Res.* 35, 7044-7060.
- Mechanic, L.E., Hall, M.C., and Matson, S.W. (1999). *Escherichia coli* DNA helicase II is active as a monomer. *J. Biol. Chem.* 274, 12488-12498.
- Morris, P.D. and Raney, K.D. (1999). DNA helicases displace streptavidin from biotin-labeled oligonucleotides. *Biochemistry* 38, 5164-5171.
- Morse, R., O'Hanlon, K., and Collins, M.D. (2002). Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase of gram-positive and gram-negative bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1477-1484.
- Motackova, V., Sanderova, H., Zidek, L., Novacek, J., Padrta, P., Svenkova, A., Korelusova, J., Jonak, J., Krasny, L., and Sklenar, V. (2010). Solution structure of the N-terminal domain of *Bacillus subtilis* delta subunit of RNA polymerase and its classification based on structural homologs. *Proteins* 78, 1807-1810.
- Muzzin, O., Campbell, E.A., Xia, L., Severinova, E., Darst, S.A., and Severinov, K. (1998). Disruption of *Escherichia coli* hepA, an RNA polymerase-associated protein, causes UV sensitivity. *J. Biol. Chem.* 273, 15157-15161.
- Nicolas, P., Mader, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Hartig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le, C.L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rugheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stulke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., van Dijl, J.M., Hecker, M., Volker, U., Bessieres, P., and Noirot, P. (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335, 1103-1106.
- Ogasawara, N. (2000). Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res. Microbiol.* 151, 129-134.
- Pause, A. and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11, 2643-2654.

- Pemberton, I.K., Muskhelishvili, G., Travers, A.A., and Buckle, M. (2000). The G+C-rich discriminator region of the *tyrT* promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *J. Mol. Biol.* 299, 859-864.
- Qi, Y. and Hulett, F.M. (1998). PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Mol. Microbiol.* 28, 1187-1197.
- Rabatinova, A., Sanderova, H., Matejckova, J.J., Korelusova, J., Sojka, L., Barvik, I., Papouskova, V., Sklenar, V., Zidek, L., and Krasny, L. (2013). The delta subunit of RNA polymerase is required for rapid changes in gene expression and competitive fitness of the cell. *J. Bacteriol.*
- Ross, W., Ernst, A., and Gourse, R.L. (2001). Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.* 15, 491-506.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R.L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407-1413.
- Ross, W., Thompson, J.F., Newlands, J.T., and Gourse, R.L. (1990). *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *EMBO J.* 9, 3733-3742.
- Severinov, K. (2000). RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 118-125.
- Sevim, E., Gaballa, A., Belduz, A.O., and Helmann, J.D. (2011). DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* and *Aeribacillus pallidus* AC6 sigma(D) proteins. *J. Bacteriol.* 193, 575-579.
- Shaw, G., Gan, J., Zhou, Y.N., Zhi, H., Subburaman, P., Zhang, R., Joachimiak, A., Jin, D.J., and Ji, X. (2008). Structure of RapA, a Swi2/Snf2 protein that recycles RNA polymerase during transcription. *Structure.* 16, 1417-1427.
- Soultanas, P. and Wigley, D.B. (2001). Unwinding the 'Gordian knot' of helicase action. *Trends Biochem. Sci.* 26, 47-54.
- Steitz, T.A., Smerdon, S.J., Jager, J., and Joyce, C.M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* 266, 2022-2025.
- Sterlini, J.M. and Mandelstam, J. (1969). Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* 113, 29-37.
- Sukhodolets, M.V., Cabrera, J.E., Zhi, H., and Jin, D.J. (2001). RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription. *Genes Dev.* 15, 3330-3341.
- Sukhodolets, M.V. and Jin, D.J. (1998). RapA, a novel RNA polymerase-associated protein, is a bacterial homolog of SWI2/SNF2. *J. Biol. Chem.* 273, 7018-7023.

- Sukhodolets, M.V. and Jin, D.J. (2000). Interaction between RNA polymerase and RapA, a bacterial homolog of the SWI/SNF protein family. *J. Biol. Chem.* 275, 22090-22097.
- Tackett, A.J., Morris, P.D., Dennis, R., Goodwin, T.E., and Raney, K.D. (2001). Unwinding of unnatural substrates by a DNA helicase. *Biochemistry* 40, 543-548.
- Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M., and Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* 11, 127-138.
- Tuteja, N. and Tuteja, R. (2004a). Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur. J. Biochem.* 271, 1835-1848.
- Tuteja, N. and Tuteja, R. (2004b). Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *Eur. J. Biochem.* 271, 1849-1863.
- Vassilyev, D.G. (2009). Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 691-700.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417, 712-719.
- Velankar, S.S., Soultanas, P., Dillingham, M.S., Subramanya, H.S., and Wigley, D.B. (1999). Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97, 75-84.
- Vrentas, C.E., Gaal, T., Berkmen, M.B., Rutherford, S.T., Haugen, S.P., Vassilyev, D.G., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008). Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J. Mol. Biol.* 377, 551-564.
- Whipple, F.W. and Sonenshein, A.L. (1992). Mechanism of initiation of transcription by *Bacillus subtilis* RNA polymerase at several promoters. *J. Mol. Biol.* 223, 399-414.
- Wong, I. and Lohman, T.M. (1992). Allosteric effects of nucleotide cofactors on *Escherichia coli* Rep helicase-DNA binding. *Science* 256, 350-355.
- Xue, X., Tomasch, J., Sztajer, H., and Wagner-Dobler, I. (2010). The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. *J. Bacteriol.* 192, 5081-5092.
- Yarranton, G.T. and Gefter, M.L. (1979). Enzyme-catalyzed DNA unwinding: studies on *Escherichia coli* rep protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 1658-1662.
- Yeh, H.Y., Chen, T.C., Liou, K.M., Hsu, H.T., Chung, K.M., Hsu, L.L., and Chang, B.Y. (2011). The core-independent promoter-specific interaction of primary sigma factor. *Nucleic Acids Res.* 39, 913-925.
- Yuzenkova, Y., Tadigotla, V.R., Severinov, K., and Zenkin, N. (2011). A new basal promoter element recognized by RNA polymerase core enzyme. *EMBO J.* 30, 3766-3775.